UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Série U. N° 121

Contribution à l'étude numérique et pondérale de la multiplication microbienne

Étude des variations morphologiques des germes au cours de la culture

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

présentée et soutenue le 1947

PAR

PHAM-GIA-HUYNH

Pharmacien

Ex-Interne des Hôpitaux de Paris

JURY { MM. A. SARTORY, *Président.*
G. VALETTE, *Professeur.*
Mlle S. LAMBIN, *chargée des fonctions de Maître de Conférences.*

PARIS
IMPRIMERIE VUIBERT
6, rue Martel

1947

FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

Nom du Candidat : **PHAM-GIA.**

Prénom : **Huynh.**

Date de la soutenance : .....

Numéro d'ordre : 121

1

PHAM-GIA (Huynh). — Contribution à l'étude numérique et pondérale de la multiplication microbienne. — Étude des variations morphologiques des germes au cours de la culture. — *Paris*, Imprimerie Polyglotte Vuibert, 1947, in-8°, 144 p.

Th. Pharm. Doct. Univ. Paris, 1947, Série U. N° 121.

2

PHAM-GIA (Huynh). — Contribution à l'étude numérique et pondérale de la multiplication microbienne. — Étude des variations morphologiques des germes au cours de la culture. — *Paris*, Imprimerie Polyglotte Vuibert, 1947, in-8°, 144 p.

Th. Pharm. Doct. Univ. Paris, 1947, Série U. N° 121.

3

PHAM-GIA (Huynh). — Contribution à l'étude numérique et pondérale de la multiplication microbienne. — Étude des variations morphologiques des germes au cours de la culture. — *Paris*, Imprimerie Polyglotte Vuibert, 1947, in-8°, 144 p.

Th. Pharm. Doct. Univ. Paris, 1947. Série U. N° 121.

4

PHAM-GIA (Huynh). — Contribution à l'étude numérique et pondérale de la multiplication microbienne. — Étude des variations morphologiques des germes au cours de la culture. — *Paris*, Imprimerie Polyglotte Vuibert, 1947, in-8°, 144 p.

Th. Pharm. Doct. Univ. Paris, 1947. Série U. N° 121.

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Série U. N° 121

Contribution à l'étude numérique et pondérale de la multiplication microbienne

Étude des variations morphologiques des germes au cours de la culture

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

présentée et soutenue le 1947

PAR

PHAM-GIA-HUYNH

Pharmacien

Ex-Interne des Hôpitanx de Paris

JURY { MM. A. SARTORY, *Président.*
G. VALETTE, *Professeur.*
Mlle S. LAMBIN, *chargée des fonctions de Maître de Conférences.*

PARIS
IMPRIMERIE VUIBERT
6, rue Martel

1947

Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

ADMINISTRATION :

MM. René FABRE, *Doyen*, ✲, ✪ I.
Henri SOMMELET, *Assesseur*, ✲, ✪ I.
H.-J. LIONNET, *Secrétaire*, ✲, ✪ I.

PROFESSEURS :

MM.	SOMMELET, ✲, ✪ I.	Chimie organique.
	FABRE, ✲, ✪ I.	Toxicologie.
	PICON, ✲, ✪ I.	Chimie minérale.
	DELABY, ✲, ✪ I.	Pharmacie chimique.
	MASCRÉ, ✲, ✪ I.	Botanique.
	SARTORY, C. ✲, ✪ I.	Microbiologie.
	FLEURY, ✲, ✪ I.	Chimie biologique.
	JANOT, ✪ I.	Pharmacie galénique.
	VALETTE, ✪ I.	Zoologie appliquée.
	CHARONNAT, ✪ I.	Chimie analytique.
	BEDEL, ✲, ✪ I.	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie.
	PARIS	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale.
	GUILLOT	Physique.
	RAOUL	Professeur sans chaire.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Doyens honoraires : MM. RADAIS, O. ✲, ✪ I. — GUÉRIN, O. ✲, ✪ I.

Professeurs honoraires :

MM. DELÉPINE, O. ✲, ✪ I. et LÉBEAU, O. ✲, ✪ I., Membres de l'Institut
PERROT, C. ✲, ✪ I., COUTIÈRE, O. ✲, ✪ I, BOUGAULT, O. ✲, ✪ I.
LUTZ, ✲, ✪ I., GORIS, O. ✲, ✪ I., HÉRISSEY, O. ✲, ✪ I., LAUNOY, O. ✲, ✪ I.

MAITRES DE CONFÉRENCES :

MM.	GAUTIER, ✪ I.	Sciences physiques et chimiques.
	N.	Sciences naturelles.
	DOMANGE, ✪ I.	Sciences physiques et chimiques.
	CRÉTÉ.	Sciences naturelles.
	N.	Sciences physiques et chimiques.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES :

MM.	CORRIEZ, ✪ I.	Physique.
	COURTOIS.	Chimie biologique, Bromatologie et Pharmacie chimique.
	MORETTE, travaux pratiques de 2e et 3e années.	Chimie analytique.
Mlle	LAMBIN, ✪ I.	Microbiologie.
MM.	HARISPE, travaux pratiques de 1re année.	Chimie générale et pharmaceutique.
	N.	Micrographie.

Bibliothécaire en Chef : M. GARNIER, ✪ A.

Bibliothécaire : Mlle LAVAUD, ✪ A.

A MON PÈRE, A MA MÈRE

Humble expression de toute mon affection.

A MA FAMILLE

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543514_0026

A LA MÉMOIRE

DU PROFESSEUR J. RÉGNIER

A qui je dois le sujet de cette thèse.

En pieux hommage de ma fidèle gratitude et de ma respectueuse affection.

A Monsieur le Doyen A. SARTORY

Professeur à la Faculté de Pharmacie
Commandeur de la Légion d'Honneur

Qui a bien voulu me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse.

En témoignage de ma respectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur G. VALETTE

Professeur à la Faculté de Pharmacie
Pharmacien des Hôpitaux

Qui me fait l'honneur de faire partie du jury de cette thèse.

En hommage de ma respectueuse reconnaissance.

A Mademoiselle S. LAMBIN

Chef des Travaux Pratiques de Microbiologie
Chargée des fonctions de Maître de Conférences
à la Faculté de Pharmacie

A qui je dois la réalisation de ce travail.

Et qui a bien voulu me faire l'honneur de faire partie du jury de cette thèse.

En témoignage de mes très sincères remerciements et de mon respectueux dévouement.

INTRODUCTION

Depuis de nombreuses années, notre regretté Maître J. Régnier, avec l'aide de ses collaborateurs, avait étudié l'évolution quantitative des cultures microbiennes. Pour suivre le croît microbien, il fut amené à préciser et à mettre en œuvre différents procédés de numération des bactéries. Ces recherches lui permirent, après avoir vérifié les conceptions antérieures relatives aux diverses phases de la multiplication microbienne, de discuter l'existence de la phase de latence, d'étudier les variations du croît microbien en fonction de l'âge de la culture, du nombre de germes ensemencés au départ, et de diverses conditions physiques et chimiques du milieu de culture.

Au moment où J. Régnier nous confia ce travail, venaient d'être mis en pratique des creusets filtrants en verre d'Iéna, qui permettaient de séparer les bactéries de leur milieu de culture, et offraient ainsi la possibilité de suivre facilement l'évolution quantitative des cultures par pesée de la masse microbienne formée.

Nous fûmes donc chargé d'utiliser ce nouveau procédé d'étude, pour rechercher quel rapport existait dans une culture microbienne en évolution, entre le nombre des germes présents et le poids de la masse bactérienne correspondante.

Nos essais furent effectués en cultivant les bactéries d'une part dans le bouillon de viande ordinaire, et, d'autre part, dans un milieu synthétique additionné au besoin d'un facteur de croissance, milieu particulièrement adapté à des études pondérales.

Les résultats obtenus nous ayant permis de constater des écarts intéressants entre les augmentations des

nombres des germes et celles de leurs poids, nous avons été amené, pour les expliquer, à rechercher ensuite dans quelle mesure ces rapports pouvaient être influencés par les modifications morphologiques des germes au cours du développement des cultures.

Ce sont ces différents essais que nous exposons dans ce travail, travail qui a été longtemps interrompu du fait des circonstances, et que nous n'avons pu rédiger que plusieurs années après son élaboration.

Nous y avons successivement exposé :

Dans un *premier chapitre,* un rappel très sommaire des diverses méthodes proposées pour l'étude quantitative de la multiplication microbienne, puis une description détaillée des techniques que nous avons utilisées pour effectuer nos propres essais.

Dans le *deuxième chapitre,* les résultats obtenus dans l'étude de la multiplication du Staphylocoque doré, soit par numération, soit par pesée des germes, cultivés d'une part en milieu synthétique et d'autre part en bouillon de viande.

Au cours du *troisième chapitre,* nous avons étudié, dans une première partie, la multiplication du Colibacille en milieu synthétique, cette multiplication étant suivie à la fois par les méthodes de pesée et de dénombrement des germes. Puis, dans une seconde partie, nous avons décrit les variations morphologiques du même germe au cours de son développement, d'une part en milieu synthétique et d'autre part en bouillon de viande.

Si ce travail a pu être mené à bien, c'est tout d'abord grâce aux suggestions et aux encouragements de J. Régnier. Notre regretté Maître, en même temps qu'il nous assistait de son érudition, nous témoignait une bienveillance et une indulgence dignes d'un homme au cœur noble, dont toute la vie a été consacrée à la cause de la Science. Nous avons perdu en lui un Maître aimé et la Bactériologie un cherheur inlassable. C'est avec beaucoup d'émotions que nous écrivons ces lignes, car

nous savons que nous ne pourrons jamais plus lui témoigner de vive voix toute notre reconnaissance et notre affection.

Notre thèse a été guidée de près par Mlle S. Lambin, Docteur ès sciences, Chef des Travaux pratiques de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie de Paris. Nous ne saurions comment lui exprimer notre gratitude pour les conseils éclairés qu'elle nous a sans cesse prodigués, et l'aide si précieuse qu'elle nous a apportée pour nous permettre de réaliser ce modeste travail. Nous lui présentons très simplement nos sincères remerciements, faible témoignage de notre reconnaissance et de notre respectueux attachement.

M. le Doyen A. Sartory a bien voulu accueillir aimablement notre travail et accepter la présidence de cette thèse; nous l'en remercions très respectueusement.

M. le Professeur G. Valette a bien voulu également accepter de faire partie de notre jury; nous lui exprimons l'expression de notre respectueuse gratitude.

Nous tenons à remercier ici la Faculté de Pharmacie de Paris qui nous a accordé en 1943 une subvention d'études sur le legs Moissan.

Enfin, nous ne voulons pas oublier nos anciens collègues et nos jeunes camarades d'internat de l'Hôtel-Dieu qui nous ont toujours témoigné une affection fraternelle et une franche camaraderie, nous permettant d'adoucir quelque peu les rigueurs d'une nostalgie prolongée, et surtout nous apprenant à mieux connaître et la France et l'élite française. Qu'ils veuillent bien trouver ici l'assurance de notre sympathie et de nos sentiments affectueusement dévoués.

CHAPITRE I

Rappel des techniques utilisables et description des techniques utilisées pour l'étude quantitative de la multiplication microbienne.

A

Rappel sommaire des techniques utilisables pour l'étude quantitative de la multiplication microbienne.

Nous n'avons pas l'intention d'étudier ici en détail les diverses techniques qui ont été proposées pour suivre l'évolution quantitative d'une culture microbienne. La description et la critique de ces méthodes ont déjà été largement exposées dans différentes thèses effectuées au laboratoire de J. Régnier (R. David, 21; L. Neipp, 63; R. Lory, 53, etc.). Nous nous contenterons de passer en revue très sommairement ces différentes techniques, en insistant sur celles que nous avons utilisées pour nos propres essais.

Ces techniques peuvent être classées en quatre grands groupes :

1° Les *méthodes numériques,* qui consistent :

a) Soit à dénombrer au microscope les microbes

visibles, obtenant ainsi le nombre total des microbes morts ou vivants;

b) Soit à ensemencer une quantité déterminée de culture sur un milieu solidifié et à rechercher le nombre de microbes capables de se développer dans ce milieu neuf.

2° Les *méthodes pondérales,* qui consistent à déterminer la masse microbienne, soit par pesée des bactéries, soit indirectement par mesure de leur volume.

3° Les *méthodes néphélémétriques,* basées sur des appréciations du degré d'opacité des cultures.

4° Les *méthodes biochimiques,* qui permettent de mesurer l'activité biochimique des bactéries, en dosant dans le milieu de culture, les éléments formés ou disparus au cours de la poussée microbienne.

1° **Méthodes numériques**.

a) *Numération microscopique des microbes visibles.*

Cette numération peut être faite par voie directe ou indirecte.

La *numération directe* des bactéries contenues dans un volume donné de suspension microbienne fut proposée en premier lieu par Alex Klein (42) en 1900, et perfectionnée depuis par de nombreux auteurs (Hehewerth (33), Thöni et Thaysen (83), Henrici (34), Henriques (36), etc. On utilise actuellement des « cellules compte-microbes », sortes de petits hématimètres qui, si elles sont de manipulation simple, offrent l'inconvénient d'une mise au point délicate et de possibilités d'erreurs dues à la difficulté de sédimentation des germes (F. Glynn, M. Powel, A. A. Rees et G. L. Cox (31), Fred Vlès (86), Troester (84), J. Régnier et L. Neipp (71).

Signalons une méthode originale, mais d'application assez délicate, proposée en 1943 par A. M. Ronchèse

(74), et dont le principe est le suivant : un mélange à parties égales de la suspension microbienne à dénombrer et d'une solution de chlorure d'argent colloïdal est étalé sur lame en présence d'un sol de gélose-gélatine permettant une dessication rapide et un étalement mince et régulier; un dosage volumétrique du chlorure d'argent permet d'évaluer le volume correspondant de la suspension microbienne dans laquelle les germes sont d'autre part dénombrés par voie microscopique.

La *numération indirecte* fut mise au point en 1902 par un bactériologiste anglais A. E. Wright (90) qui proposa de mélanger en proportions connues, une émulsion titrée d'éléments figurés (hématies humaines) et l'émulsion microbienne à titrer, et après étalement et coloration d'une fraction du mélange, de déterminer la proportion respective des éléments figurés et des bactéries présentes par champs microscopiques.

Cette technique fut modifiée en 1921 par Fries (28) qui proposa de remplacer les hématies par des cellules de levure de bière, de meilleure conservation. R. David (21) en 1931, S. Lambin (50) en 1933, et L. Neipp (63) en 1937 utilisèrent particulièrment cette méthode au laboratoire de J. Régnier, en la perfectionnant.

La méthode microscopique indirecte de Wright-Fries permet d'obtenir des résultats suffisamment approchés, à condition de dénombrer un grand nombre d'éléments.

b) *Numération des germes dits « vivants », après ensemencement sur un autre milieu.*

Cette numération peut se faire après dilution de la culture étudiée et ensemencement d'une fraction connue dans un milieu liquide. C'est la méthode classique des « dilutions », utilisée de façon courante dans les laboratoires pour le dénombrement des germes dans l'eau, dans le lait, etc., méthode que Pasteur utilisa pour la première fois en 1860, pour calculer le nombre de microbes contenus dans l'air.

Mais pour suivre l'évolution d'une culture, on emploie plus communément la méthode de numération après dilution et ensemencement sur un milieu solidifié, préconisée en 1884 par Koch, qui utilisa tout d'abord le bouillon gélatiné.

Cette méthode, maintenant classique, a été rapidement généralisée et perfectionnée par divers auteurs (Miller (58), Buchner (13), Eijkmann (22) qui cherchèrent à réaliser un dispositif permettant l'obtention de colonies isolées, facilement dénombrables. Ils furent ainsi amenés à préconiser l'utilisation des milieux gélosés répartis en boîtes de Pétri.

D'autres auteurs (Ruata et Claudnitz (75), Hesse et Riedner (37), Otto Munsch (61) estimant que la forte dilution des milieux de culture, antérieure à l'ensemencement risquaient d'augmenter les erreurs de la technique, cherchèrent à éviter cette dilution. Cependant, J. Régnier et S. Lambin (68), étudiant cette question en 1933, n'ont pu observer aucune variation des résultats en fonction des dilutions effectuées. Pour obtenir une répartition homogène des germes dans les dilutions successives effectuées à partir de la culture à étudier, ils préconisèrent des agitations suffisamment prolongées (environ cinq minutes) en présence des billes de verre. Ils conclurent de leurs expériences qu'il ne fallait pas craindre d'effectuer des dilutions convenables pour pouvoir obtenir sur chacune des boîtes de Pétri ensemencées, un nombre de colonies faciles à dénombrer. Nous avons adopté ces règles dans l'utilisation de cette technique.

2° Méthodes pondérales.

Les méthodes pondérales nous permettent de connaître le poids total des microbes morts ou vivants existant dans une culture.

Certains auteurs ont proposé de mesurer le volume de la masse microbienne en séparant les microbes du

milieu de culture par centrifugation à grande vitesse (7.000 tours à la minute) pendant quinze minutes, dans des tubes spécialement gradués. Du volume du culot obtenu, on déduit la quantité de microbes. Cette méthode, un peu trop approximative, ne semble avoir qu'une valeur relative.

Plus souvent on détermine le poids des bactéries développées en *pesant* le culot de centrifugation de l'émulsion microbienne.

Cette technique, employée d'abord par Sabouraud (76) pour le titrage des vaccins à staphylocoques, fut perfectionnée par Fred Vlès (86) qui préconisa de laver le culot microbien plusieurs fois à l'eau distillée pour le débarrasser des substances adsorbées, et de le dessécher ensuite jusqu'à poids constant.

En 1942, Monod (59) employa cette méthode et trouva que les écarts atteignaient 10 % entre les diverses déterminations, étant données les faibles quantités des matières récoltées.

Depuis plusieurs années, on peut disposer de creusets en verre d'Iéna, munis d'une plaque filtrante en verre fritté (G 5/3) d'une porosité assez fine pour arrêter les bactéries. La détermination de la masse microbienne peut alors s'effectuer très simplement par filtration d'une quantité connue de culture et par pesée des bactéries restées sur le filtre.

Cette méthode nous paraissait assez précise, d'après les résultats observés par D. Bach (4), et d'après les essais effectués par un de nos camarades au laboratoire de J. Régnier (*). Nous exposerons plus loin (v. page 26) les détails de cette technique que nous avons adoptée pour nos mesures pondérales.

En recherchant le degré de précision de cette technique, D. Bach avait constaté que les résultats pouvaient atteindre une précision de 2 % lorsqu'il s'agissait

(*) Essais non encore publiés.

d'une suspension microbienne filtrée au préalable sur un creuset à pores assez larges (G 3) pour éliminer les grumeaux provenant du milieu de culture. Par contre, avec une culture de staphylocoques dorés en eau peptonée glucosée, âgée de 24 heures, ou avec une suspension microbienne non filtrée au préalable sur un creuset G 3, l'erreur pouvait dépasser 10 %. Ayant utilisé cette technique pour suivre la croissance du staphylocoque doré, D. Bach fut amené à conclure qu'il « n'y a aucune relation constante entre le nombre de bactéries présentes dans un milieu de culture et leur poids », et que les numérations bactériennes donnent une idée certainement fausse de la masse de matière vivante réellement édifiée au cours d'une culture.

Par contre, A. Sartory, J. Meyer et D. Schmutz (79), désirant effectuer simultanément des dénombrements à la cellule compte-microbes de Liebreich, des mesures de volume, de poids, comparativement à des mesures photoélectriques, rejetèrent l'emploi de ces creusets filtrants, d'un poids, d'après eux, trop disproportionné avec la faible masse bactérienne à peser. Ils s'en tinrent finalement à une comparaison des valeurs néphélémétriques avec les résultats des numérations directes des germes et conclurent que « les résultats néphélémétriques sont en relation directe avec le nombre des germes présents dans une culture, à condition que l'âge et la concentration de celle-ci ne dépassent pas certaines limites ».

Tel était aussi l'avis de Léo v. Wikullil (87).

3° **Méthodes néphélémétriques.**

Ces méthodes sont basées sur l'évaluation du trouble apporté aux milieux liquides par la masse microbienne qui s'y développe.

Ce fut Fred Vlès (86) qui, l'un des premiers, construisit, en 1921, un appareil opacimétrique qui donna rapi-

dement et avec assez de précision la teneur en substances bactériennes des vaccins.

Depuis, de nombreux appareils ont été proposés. On en trouvera l'étude détaillée dans la monographie de M. Faguet (24) et dans la thèse récente de R. César (15), effectuée au laboratoire de J. Régnier.

Bien que l'utilisation de cellules photoélectriques ait permis une très grande amélioration de ces techniques, elles sont encore sujettes à certaines critiques. En particulier, elles ne permettent réellement de suivre la multiplication microbienne dans un milieu liquide qu'à la condition d'utiliser des mlieux ne précipitant pas au cours de la culture, et ne semblent être utilisables qu'entre certaines limites d'opacité.

4° **Méthodes biochimiques.**

Ces méthodes consistent à doser, dans le milieu de culture, les produits formés ou disparus pendant le développement des bactéries.

Elles s'adressent tout particulièrement aux études sur les fermentations.

Dès 1872, Petit (65) étudia l'influence sur les fermentations de l'addition de certaines substances chimiques, en prenant comme mesure de l'activité fermentative les quantités de CO^2 dégagées.

Biernacki (10), en 1891, détermina les doses de divers produits qui arrêtaient la fermentation alcoolique.

Ch. Richet (73), Chassevant (16), Cardot (14) et Bachrach (5) étudièrent l'influence sur la fermentation lactique de facteurs antiseptiques divers, en mesurant volumétriquement l'acide lactique formé au cours de la fermentation.

Il y a quelques années, en 1943, A. M. Ronchèse (74) pensa pouvoir estimer la richesse en bactéries d'une émulsion par un dosage de l'azote entrant dans la constitution des corps bactériens. Mais l'auteur reconnut

que sa méthode ne donnait que des résultats approximatifs et était applicable surtout aux lysats microbiens, à condition que ceux-ci provinssent de germes préalablement débarrassés des produits azotés des milieux de culture.

Tout récemment, en 1946, A. Sartory et J. Meyer (77) ont entrepris une étude sur le développement du Colibacille en milieu synthétique ammoniacal, par contrôle de l'acidification du milieu, en prenant comme témoin le même milieu peptoné à 1 %. Ils ont déjà pu noter que l'optimum de croissance et de multiplication qui était atteint dans le milieu témoin dès le premier jour de culture ne semblait pas encore réalisé dans le milieu synthétique ammoniacal « où le colibacille, par suite d'un métabolisme énergétique moins favorable, a à peine atteint la zone limite de l'optimum de croissance vers le troisième jour ».

B

Description des techniques utilisées au cours de nos essais.

Pour suivre la multiplication microbienne, nous avons utilisé au cours de nos essais :

D'une part, des méthodes de *dénombrement :*

— dénombrement des germes capables de se reproduire sur gélose.

— et dénombrement microscopique de la totalité des germes (technique de Wright-Fries).

D'autre part, une technique de *pesée,* permettant d'apprécier les masses microbiennes aux différentes heures de culture.

a) Technique de dénombrement après dilution et ensemencement sur gélose.

1° *Préparations préliminaires.*

Nous ensemencions tout d'abord le germe à étudier (staphylocoque ou colibacille) sur gélose inclinée. Après 24 heures de culture à 37°, nous prélevions une anse de la culture que nous émulsionnions dans 10 cc. d'eau distillée stérile. Un centimètre cube environ de cette émulsion était introduit dans 100 cc. de notre milieu de culture (milieu synthétique ou bouillon de viande) contenu dans un ballon de 300 cc. garni de billes de verre.

Aussitôt après l'ensemencement de ce milieu, nous y prélevions 1 cc. destiné à déterminer la concentration initiale en germes. Puis nous placions le ballon contenant notre culture à l'étuve à 37° ; nous effectuions, par

la suite, des prélèvements à des périodes déterminées, en vue de procéder au dénombrement des bactéries.

Avant d'effectuer chaque prélèvement, nous soumettions notre culture à de vives agitations, puis le prélèvement aussitôt terminé, nous la replacions immédiatement à l'étuve.

2° *Dilution.*

Afin de faciliter le dénombrement des bactéries dans les différents prélèvements, nous avons effectué des dilutions avant de procéder à l'ensemencement sur gélose. Ces dilutions étaient réalisées en eau distillée stérile :

Un centimètre cube de la culture mère était introduit dans un ballon contenant 10 cc. ou 100 cc. d'eau distillée stérile et des billes de verre. Après de vives agitations, les dilutions étaient poursuivies de la même façon jusqu'à obtention d'un taux convenable. En général, aux premières heures de culture, les dilutions au 1/100.000^{e} étaient suffisantes, mais à partir de la 6^{e} ou 8^{e} heure, les taux de $1/10^{-8}$ ou $1/10^{-11}$ étaient nécessaires pour avoir un nombre de bactéries facile à compter.

3° *Ensemencement sur gélose.*

Les dilutions ayant été effectuées, il nous restait à procéder à l'ensemencement sur un milieu solidifié. Nous avons employé du bouillon gélosé de formule courante, réparti dans des tubes à essai, par fractions de 12 centimètres cubes. Au début des essais, ces milieux gélosés étaient liquéfiés au bain-marie bouillant, puis maintenus vers 45° jusqu'au moment de l'ensemencement.

Du dernier ballon de dilution, après de vives agitations, nous prélevions 1 cc. que nous laissions tomber dans l'un des tubes de gélose liquéfiée. Puis après quelques énergiques mouvements de rotation imposés au tube par le jeu des mains, nous coulions la gélose ense-

mencée dans une boîte de Pétri préalablement stérilisée. Nous effectuions cette opération en double, ce qui nous fournissait, pour chaque dilution, deux boîtes de Pétri. Après solidification de la gélose, nous placions ces boîtes à l'étuve à 37°, couvercle en dessous, pour éviter que l'eau de condensation ne vint retomber sur la surface des milieux ensemencés. Ceux-ci étaient maintenus à l'étuve pendant 48 heures.

4° *Numération et calcul des résultats.*

Les colonies développées au bout de 48 heures sur les plaques de gélose se remarquaient aisément à l'œil nu. Chaque colonie correspondait à une bactérie « vivante » (ou plus exactement « repiquable ») existant dans notre milieu de culture.

Soient x et x' les nombres de colonies dénombrées respectivement sur chaque boîte de Pétri ensemencée à l'heure H, et soit D le taux de dilution réalisé pour l'ensemencement. Le nombre N de microbes existant dans un centimètre cube de notre milieu de culture à l'heure H est donné par la formule :

$$N = \frac{x + x'}{2} \quad D$$

(b) Technique de dénombrement microscopique indirect.

Nous avons utilisé la méthode comparative de Wright-Fries, qui consiste à mélanger une quantité connue de l'émulsion microbienne à titrer à une quantité connue d'une émulsion de levure de titre déterminé, puis après étalement et coloration d'une fraction du mélange, à dénombrer les proportions respectives des éléments microbiens et des cellules de levure par champ du microscope. La technique utilisée était celle pratiquée depuis de nombreuses années au laboratoire de J. Régnier. Elle comportait plusieurs temps :

1° Préparation et titrage de l'émulsion de levure;
2° Préparation de l'émulsion microbienne;
3° Préparation et coloration du mélange levures-bactéries;
4° Numération des éléments et calcul des résultats.

1° *Préparation et titrage de l'émulsion de levure.*

Nous avons employé de la levure de boulanger bien fraîche. Une petite quantité (environ un gramme) était triturée au mortier avec un peu d'eau distillée, jusqu'à obtention d'une pâte bien homogène. Nous transvasions ce mélange dans un ballon contenant environ 100 cc. d'eau distillée stérile et des billes de verre; nous agitions pendant longtemps et énergiquement, de manière à bien homogénéiser l'émulsion; nous y ajoutions un centimètre cube de chloroforme pour assurer une bonne conservation et nous la gardions à la glacière.

Pour titrer cette émulsion, nous en mélangions 1 cc. avec 10 cc. d'eau distillée, de manière à obtenir une dilution au 1/10e. Une goutte de cette dilution était ensuite déposée dans la cellule d'un hématimètre de Malassez. Nous comptions au microscope les cellules de levure contenues dans plusieurs rectangles et nous prenions la moyenne des résultats.

Soit N cette moyenne.

Le volume correspondant à chaque rectangle étant de 1/100e de millimètre cube, nous avions donc, par millimètre cube d'émulsion diluée : N × 100 cellules.

Comme nous avions employé une dilution au 1/10e, le titre de notre rémulsion de levure devenait donc finalement : N × 1.000 cellules par centimètre cube.

2° *Préparation de l'émulsion microbienne.*

Nous partions des cultures sur gélose inclinée ayant séjourné 24 heures à l'étuve à 37°. Nous en prélevions une anse que nous émulsionnions dans notre milieu de culture, contenu dans un ballon garni de billes de verre. Nous agitions ce ballon pendant longtemps pour bien

homogénéiser l'émulsion. Puis nous en prélevions 1 cc. pour faire la numération à l'heure 0, et nous placions immédiatement le ballon à l'étuve à 37°. Nous ne l'en sortions qu'aux heures prévues pour effectuer des prélèvements pour nos essais.

3° *Préparation et coloration du mélange levures-bactéries.*

Aux heures prévues pour nos essais, nous sortions la culture microbienne de l'étuve et l'émulsion de levure de la glacière, et nous agitions pendant longtemps les deux ballons. Nous prélevions 1 cc. de l'émulsion de levure que nous mélangions avec une quantité déterminée de la culture microbienne (1 cc. aux premières heures et 0 cc. 2 à partir de la 24e heure) dans un tube à essai contenant des billes de verre. Nous agitions vivement ce mélange, puis, très rapidement (afin d'empêcher une sédimentation possible), à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, nous en prélevions une petite quantité, nous en rejetions la première goutte, puis nous déposions une goutte sur une lame bien propre et bien dégraissée (ayant séjourné dans l'alcool ammoniacal). Avec une autre pipette Pasteur fermée à son extrémité, nous étalions la goutte en la déplaçant en tous sens. Nous préparions ainsi quatre lames. Nous les laissions sécher à l'air sans les chauffer. Nous fixions à l'alcool-éther et nous colorions par contact de cinq minutes avec une dilution aqueuse à 10 p. 100 de fuchsine de Ziehl.

Nous lavions soigneusement les préparations à l'eau distillée en laissant couler très doucement l'eau sur l'extrémité supérieure des lames maintenues légèrement inclinées.

Nous laissions encore les lames sécher à l'air, puis nous les examinions au microscope, à l'immersion.

4° *Numération des éléments et calcul des résultats.*

Nous comptions les microbes et les cellules de levure dans un grand nombre de champs pris au hasard sur

la préparation. Nous prenions ensuite la moyenne des résultats fournis par les quatre lames.

Connaissant d'une part le titre de l'émulsion de levure (nombre de cellules par centimètre cube), et d'autre part les volumes respectifs des constituants du mélange : émulsion de levure + émulsion microbienne, ainsi que la proportion relative des levures et des bactéries après numération microscopique, il est aisé de déduire la quantité de bactéries contenues dans un centimètre cube de la culture microbienne.

Aux premières heures de culture, nous avions fait un mélange à parties égales d'émulsion microbienne et d'émulsion de levure.

Soit K le nombre de cellules de levure par centimètre cube (Titre de l'émulsion de levure).
L le nombre de cellules de levure comptées.
M le nombre de microbes comptés.

à L levures correspondaient M microbes

à I — — $\frac{M}{L}$ —

à K — — $\frac{M \times K}{L}$ —

Cette formule nous donnait le nombre de microbes par centimètre cube lorsque le mélange émulsion de levure + émulsion microbienne était fait à parties égales (aux premières heures de culture). A partir de la 24e heure, quand les microbes devenaient très nombreux, nous effectuions le mélange avec cinq fois moins d'émulsion microbienne (0 cc. 2 au lieu de 1 cc.). La formule devenait alors :

$$X = \frac{M \times K}{L} \times 5 \text{ (microbes par centimètre cube).}$$

(application de la formule générale :

$$X = \frac{\text{somme bactéries}}{\text{somme levures}} \times \frac{\text{volume levures}}{\text{volume bactéries}} \times K$$

K étant le titre de l'émulsion de levure).

Cette méthode nous donnait le nombre total des microbes « morts » et « vivants ». Parmi les premiers figuraient ceux qui n'étaient pas capables de s'adapter quand on les transportait dans un nouveau milieu (tout au moins aux premières heures). Ceux-ci échappaient donc à la numération quand nous procédions par la méthode des plaques de gélose.

c) **Technique de pesée.**

Pour nos études pondérales, nous avons utilisé des creusets filtrants spéciaux, en verre d'Iéna, munis d'une plaque filtrante en verre fritté, d'une porosité assez fine pour arrêter les bactéries (G 5/3). Ces creusets portaient tous un numéro permettant de retrouver leur degré de porosité et leur vitesse de filtration. D'après les indications du fabricant, le diamètre moyen de ces creusets variait de 0μ80 à 1μ et ne dépassait jamais 1μ25. Ces creusets devraient donc arrêter presque tous les microbes, en particulier le Staphylocoque et le Colibacille avec lesquels nous avons effectué nos essais. Nous avons d'ailleurs vérifié de la façon suivante que ces creusets ne laissaient passer aucun germe des souches à étudier :

Nous avons filtré sur tous les creusets une culture en bouillon, âgée de 24 heures et nous avons recueilli les filtrats dans des fioles de Kitasato préalablement stérilisées, que nous placions ensuite à l'étuve à 37°. Au bout de 24 heures, nous avons vérifié que les filtrats ne cultivaient pas. Aucun germe n'avait donc pu passer à travers les filtres.

La technique consistait donc à prélever aux différentes heures de l'expérience une quantité connue de la culture microbienne et à la filtrer sur des creusets préalablement tarés. La différence de poids des creusets, avant et après la filtration nous donnait le poids des microbes.

Cette technique comportait plusieurs temps, à savoir :

1° Préparation des creusets;
2° Tare des creusets;
3° Préparation de la culture microbienne;
4° Filtration;
5° Dessication et pesée des creusets;
6° Interprétation des résultats.

1° *Préparation des creusets.*

Cette opération était d'une grande importance, étant donnée la précision avec laquelle nous devions peser nos creusets (au 1/100e de milligramme près). Aussi les creusets devaient-ils être rigoureusement propres, ne retenant aucune matière susceptible d'être entraînée pendant la filtration, et qui pourrait alors fausser les résultats. Les plaques filtrantes étant de nature délicate et de porosité très fine, les opérations de lavage et de dessication devaient être faites avec beaucoup de soins et sans changement brusque de température.

Lavage. — Il fallait nous débarrasser des substances qui avaient pu colmater les filtres lors des usages antérieurs. Ces substances étaient pour la plupart des matières organiques.

Pour cela, le fabricant proposait deux mélanges :

— le mélange chromique ou

— l'acide sulfurique concentré, additionné de quelques cristaux de nitrate de potasse, et porté à la température de 80°.

Le mélange chromique présentait l'inconvénient suivant : les sels de chrome étaient fortement retenus par la surface des verres, et risquaient d'atteindre dans leur vitalité les bactéries qui y étaient ultérieurement déposées. Ce fait était susceptible de nous gêner lors des essais de vérification de stérilité des filtrats.

Nous avons donc opté pour le deuxième mélange qui ne présentait pas cet inconvénient et dont on se débarrassait facilement par des lavages à l'eau distillée.

Nous faisions dissoudre quelques cristaux de nitrate de potasse dans de l'acide sulfurique concentré contenu dans un grand cristallisoir; nous y trempions nos creusets et nous portions progressivement le tout à 80°. Puis nous le laissions refroidir jusqu'au lendemain. Nous lavions ensuite les creusets à l'eau distillée filtrée et nous les laissions encore tremper dans de l'eau distillée filtrée pendant plusieurs heures. Puis ayant adapté successivement les creusets sur le goulot d'une fiole de Kitasato, nous réalisions une aspiration par le vide; nous versions dans les creusets, à plusieurs reprises, de l'eau distillée filtrée pour enlever toute trace d'acide. Nous rangions ensuite ces creusets dans un cristallisoir bien propre que nous recouvrions d'une gaze bien épaisse, celle-ci ayant pour but d'arrêter les poussières tout en laissant évaporer de la vapeur d'eau, lors de la dessication.

Dessication. — Nous nous sommes servi de l'étuve pour sécher les creusets. Nous avons dit que ceux-ci étaient de nature délicate et qu'il ne fallait pas les soumettre à des changements de température trop brusques qui risqueraient de les détériorer. Il était donc prudent de mettre le cristallisoir contenant les creusets dans une étuve froide, et de la chauffer ensuite progressivement jusqu'à 100°, température que nous maintenions pendant vingt minutes à une demi-heure à ce niveau.

Pour retirer les creuset, nous attendions le refroidissement complet de l'étuve; puis nous les transportions à l'aide de pinces nickelées bien propres, dans un dessicateur garni de chlorure de calcium.

Il nous restait alors à tarer les creusets avant de les utiliser pour les filtrations.

2° *Tare des creusets.*

Nous avons utilisé une balance de précision au 1/100e de milligramme, construite par les établissements Longue.

La tare était constituée par un creuset, de façon à réaliser des conditions d'équilibre identiques des deux côtés de la balance. Nous effectuions les pesées par le système de la double pesée, suivant les prescriptions habituelles. Nous notions les poids des creusets d'après leurs numéros respectifs. Nous les replaçions dans le dessicateur et ils étaient prêts pour les opérations de filtration.

3° *Préparation de la culture microbienne.*

Nous partions d'une culture sur gélose inclinée ayant séjournée 24 heures à l'étuve. Nous en prélevions une anse, que nous émulsionnons dans 100 cc. d'eau distillée stérile. L'émulsion ayant été bien homogénéisée, nous en retirions 1 cc. que nous introduisions dans 300 cc. de notre milieu de culture (*). Nous ensemencions de cette façon notre milieu synthétique et le bouillon de viande, en vue d'effectuer deux séries d'essais parallèles.

Le milieu ensemencé et homogénéisé était immédiatement réparti, par portions de 20 cc. ou de 10 cc. (exactement mesurés avec des pipettes jaugées à deux traits) dans une série de petites fioles d'Erlenmeyer dont le contenu devait être filtré aux divers temps de l'essai.

Nous avons préféré opérer ainsi plutôt que d'effectuer des prélèvements successifs dans une seule culture globale, car la répartition était de cette façon plus homogène. D'autre part, cela évitait la diminution progressive du volume de la culture au cours de l'essai, ainsi que les contaminations accidentelles possibles. Enfin, nous pouvions entraîner par des lavages soigneux des petites fioles d'Erlenmeyer, toute trace de culture.

La répartition était faite de la façon suivante :

— Dans une série de huit fioles, nous introduisions

(*) Dans cette série d'expériences, nous avons évité de mettre des billes de verre dans les milieux de culture, ces billes pouvant abandonner des débris, entraînant des erreurs de pesée.

respectivement 20 cc. du milieu ensemencé. Ces huit fioles étaient destinées aux examens, faits en double, aux heures 0, 2, 5, 8 de culture.

— Dans dix autres fioles, nous introduisions respectivement 10 cc. du milieu ensemencé. Ces dix fioles étaient destinées aux examens, faits en double, aux heures 24, 48, et aux 4e, 7e, 14e jours de culture.

Nous avons réparti deux fois plus de culture dans les fioles destinées aux examens des premières heures, afin d'obtenir une récolte microbienne de poids appréciable.

Après la répartition du milieu ensemencé, il en restait dans le grand ballon environ 120 cc.; nous y introduisions aseptiquement des billes de verre préalablement stérilisées, et le tout devait nous servir à effectuer parallèlement un essai de numération, par la méthode des plaques de gélose.

Nous placions ce grand ballon et les petites fioles d'Erlenmeyer à l'étuve à 37°. Nous les en sortions aux heures prévues pour l'expérience, pour procéder à la filtration et à la numération.

Le contenu de deux fioles de 20 cc. nous servait immédiatement à effectuer les filtrations à l'heure 0.

4° *Filtration.*

Nous adaptions deux creusets sur deux fioles de Kitasato et nous aspirions à l'aide d'une trompe à vide.

Un examen préalable avec de l'eau distillée filtrée nous avait renseigné sur la vitesse de filtration des creusets. Nous choisissions donc les creusets les plus lents pour les premières filtrations, nous réservant ceux dont la vitesse de filtration était plus rapide pour les dernières opérations, où les masses microbiennes, plus importantes, colmataient plus ou moins les filtres.

D'ailleurs, quand la filtration devenait trop lente par suite d'un colmatage, nous ajoutions au contenu du creuset une ou deux gouttes d'une solution d'acide

chlorydrique au 1/100e qui rendaient l'opération plus facile.

Avant chaque filtration, nous agitions soigneusement les fioles pour bien détacher les amas microbiens qui restaient déposés au fond. Après avoir versé le contenu d'une fiole dans un creuset, nous rincions plusieurs fois cette fiole avec de l'eau distillée filtrée, jusqu'à ce qu'elle nous parût débarrassée de toute trace de culture.

Nous avons veillé à ce que le degré de vide fût à peu près le même pour toutes les filtrations; nous avons toujours opéré aux environs d'une dépression de 40 cm. de mercure.

5° *Dessication et pesée des creusets.*

La filtration une fois terminée, nous placions les creusets dans un cristallisoir bien propre, que nous recouvrions avec une gaze épaisse. Nous séchions le tout à l'étuve, comme il a été indiqué lors de la première dessication.

Après refroidissement complet de l'étuve, nous transportions les creusets dans un dessicateur, où nous les laissions quelques temps, avant de les peser à la balance de précision, comme il a été dit ci-dessus.

6° *Interprétation des résultats.*

Les pesées nous donnaient les poids des masses microbiennes contenues soit dans 20 cc. de milieu aux premières heures de culture, soit dans 10 cc. aux heures suivantes. Nous exprimions ces poids en milligrammes et nous les rapportions tous à un centimètre cube de milieu de culture.

CHAPITRE II

Étude comparative de la multiplication du staphylocoque doré en milieu synthétique et en milieu naturel.

Nous savons que le Staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*), cultivé en milieu naturel (bouillon de viande), passe successivement, comme les autres bactéries, par les phases habituelles de la multiplication microbienne, à savoir :

Tout d'abord, une phase de latence, puis une phase de multiplication active dite logarithmique, à laquelle succède une phase de multiplication ralentie, qui aboutit ensuite à une phase de maximum stationnaire, enfin une phase de déclin ou de destruction des bactéries.

En est-il de même maintenant, si on le cultive dans un milieu synthétique ? Les phases sont-elles les mêmes si, au lieu de suivre le développement par son évolution numérique, on le suit par son évolution pondérale ?

C'est ce que nous nous proposions de rechercher.

Avant d'aborder cette étude, rappelons brièvement quelques données relatives à la culture des bactéries en milieux synthétiques.

A

Quelques données relatives à la culture des bactéries en milieux synthétiques.

Les milieux synthétiques étant définis comme des milieux contenant seulement des sels minéraux et privés de matières protéiques, bouillon ou autres substances semblables (Anderson) (2), présentent un grand avantage sur les milieux naturels, en ce qu'ils peuvent être exactement reconstitués, permettant ainsi de comparer les caractères culturaux de deux ou de plusieurs organismes, ou de comparer d'une façon satisfaisante les résultats des études faites par différents auteurs sur le même organisme.

Les milieux synthétiques sont d'autre part indispensables dans de nombreux cas, soit pour la détermination exacte des aliments nécessaires à un organisme, soit pour l'isolement et l'identification des divers produits du métabolisme bactérien.

Aussi leur utilisation tend-elle de plus en plus à se généraliser en Bactériologie.

Le premier milieu synthétique décrit fut celui de Cohn (19) (1875), qui employa un milieu contenant du tartrate d'ammoniaque qu'il considérait comme particulièrement utile pour la culture des bactéries fluorescentes.

D'autres milieux synthétiques furent successivement proposés par Naegeli (62) en 1882, Fermi (25) en 1892, Uschinsky (85) en 1893, Beyerinck (7) en 1895, Widnogradsky (89) en 1896, etc.

Une liste de milieux synthétiques fut dressée en 1926 par Krasnow, Rivkin et Rosenberg (49) qui les classèrent en neuf groupes basés sur les types d'organismes pour lesquels les milieux étaient indiqués.

A. Lwoff (54) en 1938, dans un rapport présenté au Congrès des Microbiologistes, définit les milieux synthétiques comme « des milieux simples, où l'aliment azoté est représenté par un nitrate, l'aliment carboné énergétique par un acide organique ou un glucide, et qui renferment tous les éléments indispensables : phosphore, soufre, magnésium, fer, cuivre, zinc, etc. ».

Depuis la découverte des facteurs de croissance, on sait que, outre les aliments cités dans la définition précédente, certains microorganismes nécessitent pour leur développement, des substances déterminées : ainsi *Corynebacterium Diphteriæ* a besoin de soufre réduit (H. Baune) (12), le flagellé *Polytoma Ocellatum* n'effectue sa croissance qu'en présence de thiazol (A. Lwoff et H. Dusi) (55), le Staphylocoque doré réclame pour son développement de l'acide nicotinique et de l'aneurine (Knight) (44).

Mais ces facteurs de croissance ne doivent pas être confondus avec les « facteurs de départ » et les « stimulants ».

Pour un organisme donné, un *facteur de croissance* est une « substance dont cet organisme est incapable de réaliser la synthèse, et en l'absence de laquelle toute multiplication de cet organisme est impossible » (A. Lwoff) (54).

Par *stimulants,* on entend des substances qui ne sont pas indispensables et en l'absence desquelles l'organisme peut se développer, mais qui accélèrent plus ou moins la croissance. D'après A. Sartory et ses collaborateurs (78), ces substances — qu'ils appellent facteurs activants — « ne favorisent la croissance des bactéries qu'au début de la culture et ne déterminent qu'un amorçage rapide des cultures, accélérant la vitesse de prolifération des bacilles sans augmenter le poids final de la récolte ». Une substance peut être un facteur de croissance pour un organisme et seulement un stimulant pour un autre organisme. C'est ainsi que l'acide nicoti-

nique qui est un facteur de croissance pour le Staphylocoque se conduit seulement comme un stimulant vis-à-vis du bacille diphtérique (J.H. Mueller), 1937 (69).

Les *facteurs de départ* sont des substances qui sont nécessaires à de nombreux microorganismes lorsqu'on les isole de leur hôte animal, ou lorsqu'on les transporte brusquement d'un milieu organique complexe dans un milieu simple. Ainsi, les acides aminés sont des facteurs de départ pour le Staphylocoque, l'hémoglobine pour les bactéries hémophiles. Mais ces facteurs de départ ne sont nécessaires que pendant un ou plusieurs repiquages, et l'organisme finit par pouvoir s'en passer, tandis que le besoin de facteurs de croissance est par convention définitif.

Ce besoin de facteurs de croissance pour un organisme serait dû, d'après la définition citée plus haut, à l'absence du pouvoir d'en réaliser la synthèse.

En effet, il est classique de diviser les bactéries en deux grands groupes : en opposition avec les bactéries autotrophes qui, suffisamment riches en enzymes, sont capables de fixer le carbone de CO^2 et l'azote de NH^3 et des nitrites, les bactéries hétérotrophes nécessitent des sources de carbone et d'azote beaucoup plus complexes, car leur pouvoir synthétisant est beaucoup moins accusé.

Mais à côté des bactéries qui nécessitent des facteurs de croissance et de celles qui n'en ont pas besoin pour leur développement, il existe toute une série d'intermédiaires qui réclament soit simplement des stimulants, soit des produits particuliers.

Si l'on se range à la classification de Knight (43) on peut considérer qu'il existe tout d'abord des bactéries capables de se développer sur milieux synthétiques dépourvus de facteurs de croissance, et ne renfermant qu'une seule source de carbone (par ex. glucose ou acide organique), et une seule source d'azote (sel d'ammonium), en dehors de sels minéraux appropriés : Chro-

mobactériacées, B. Coli et genre *Escherichia* en général. Ces bactéries peuvent donc assimiler l'azote des sels ammoniacaux.

Puis viennent les bactéries qui sont encore capables d'utiliser comme source d'azote les sels ammoniacaux, mais qui préfèrent les acides aminés : *Salmonella,* B. Typhique, B. Dysentériques, Vibrions, etc...

On rencontre ensuite des bactéries comme le B. Diphtérique et le B. Tuberculeux qui nécessitent pour se développer en milieu synthétique un nombre plus ou moins grand d'acides aminés, parmi lesquels le tryptophane et la cystine semblent être indispensables. Toutefois, ces souches n'exigent pas de facteurs de croissance aussitôt après leur isolement, et peuvent être entraînés à se développer sur certains milieux. Les acides aminés ne se comportent donc pour eux que comme des facteurs de départ.

On arrive alors à des groupes de bactéries totalement privées du pouvoir synthétisant. Ces germes nécessitent du carbone organique et de l'azote organique sous forme d'un ou de plusieurs amino-acides, et au surplus des facteurs de croissance. Citons parmi eux : *Staphylococcus aureus, Cl. Sporogenes, Cl. Botulinum.*

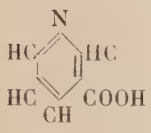
Enfin, au terme de cette différenciation, on trouve des bactéries qui nécessitent la présence de sang ou d'un liquide organique pour se multiplier. Ex. : les Gonocoques, les Méningocoques, les Pneumocoques, les bactéries du groupe *Hemophilus.*

On arrive ainsi insensiblement aux virus, complètement dépourvus du pouvoir de synthèse, et qui ne peuvent se développer qu'en présence de cellules vivantes.

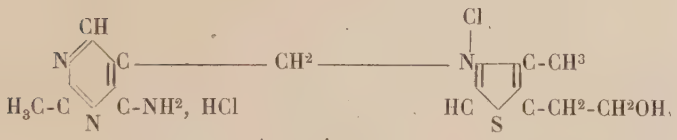
En ce qui nous concerne, nous avons eu à cultiver deux bactéries appartenant à deux groupes nettement différents : le Staphylocoque doré qui, dépourvu du pouvoir synthétisant, a besoin pour se multiplier dans les milieux synthétiques de facteurs de croissance, et le Colibacille qui, possédant la capacité de synthétiser

ses substances activantes dans les milieux synthétiques ne nécessite pas l'addition de facteurs de croissance.

a. — Ce fut Knight (44) en 1937, qui montra que les deux facteurs de croissance nécessaires pour *Staphylococcus aureus* étaient l'acide nicotinique et l'aneurine.



Acide nicotinique.



Aneurine.

La même année, G.P. Gladstone (30) travaillant sur douze souches typiques de *Staphylococcus aureus,* aboutit aux mêmes conclusions que Knight, en ce qui concerne l'acide nicotinique. Ces conclusions furent confirmées par la suite en 1938 par Koser, Finkle, Dorfman et Saunders (47), et par Kögl et W. J. Van Wagtendonk (46). Il fut également démontré que certaines variétés de bacilles dysentériques (Flexner, Hiss Y. et Strong) (47) avaient besoin d'acide nicotinique, alors que d'autres variétés pouvaient s'en passer (Koser, Dorfman et Saunders) (48). D'après Fildes (26) (1938), le bacille *Proteus* ne se multipliait qu'en présence d'acide nicotinique, qui était son seul facteur de croissance. Pour le bacille diphtérique, l'acide nicotinique se comportait seulement comme un facteur stimulant (J. H. Mueller) (60).

Knight (45) a démontré par la suite que l'amide de l'acide nicotinique était aussi active pour le Staphylocoque que son acide, à une concentration de $2{,}6 \times 10^{-8}$ M, alors que pour Landy (51), l'amide se montrait active à des dilutions dix fois plus élevées que celle de l'acide.

L'aneurine ou vitamine B^1 a été considérée depuis

longtemps comme un facteur de croissance pour les microorganismes par de nombreux auteurs : R. J. Williams (88) pour les levures, Reader (67) pour *Streptothrix Corallinus,* Tatum, Wood et Peterson (82) pour les bactéries propioniques, Schopfer (80) pour *Phycomyces.* Knight (44) a montré que l'aneurine était également un facteur de croissance pour *Staphylococcus aureus.* Mais cet auteur nota que l'aneurine pouvait être remplaqée par sa pyrimidine (2. méthyl-4. amino-5. amino méthyl pyrimidine) et son thiazol (4. méthyl-5β. hydroxyo-éthyl thiazol).

Signalons que M. Richardson (72) a démontré que pour se développer en milieu synthétique en anaérobiose, *Staphylococcus aureus* avait besoin d'uracile, constituant des acides nucléiniques. En aérobiose, ce germe pourrait, sans doute, en réaliser la synthèse (d'après Anderson) (2). L'uracile nous fournit le premier exemple d'un facteur de croissance nécessaire seulement en anaérobiose.

Signalons aussi que Gladstone (30) a pu cultiver vingt-cinq souches de *Staphylococcus aureus* sur un milieu dépourvu de tout amino-acide, même de cystine, et renfermant seulement de l'ammoniaque, après une sorte d' « entraînement » des bactéries. Les amino-acides se conduisent donc comme des facteurs de départ vis-à-vis de *Staphylococcus aureus.*

b. — Le Colibacille, comme nous l'avons vu, n'a pas besoin de facteurs de croissance pour se développer dans les milieux synthétiques.

Péré (64), dès 1892, établit un milieu constitué uniquement par des sels minéraux et contenant un sel d'ammoniaque (succinate ou lactate) comme seule source de carbone et d'azote. Le Colibacille se développait fort bien sur ce milieu, que l'auteur dénommait « milieu neutre ». De ses essais, il conclut notamment que « le B. Coli, dépourvu de caséase, secrète toutes

les diastases s'appliquant à la matière hydrocarbonée, sucrase et amylase ».

Aubel (3) en 1926 chercha à connaître les principales substances entrant dans la constitution du B. Coli afin de déterminer l'utilité des constituants de son milieu synthétique. Il observa que dans 100 grammes de poids sec de ce bacille (cultivé dans un milieu à base de gélose, petone, bouillon de pomme de terre), il entrait environ :

Albumine	65 gr. 60
Hydrate de carbone	10 —
Graisses	15 —
Cendres	9,60

Plus récemment, en 1944, dans une étude plus approfondie, Young, Begg et Pentz (91) ont cherché à déterminer quels étaient les éléments minéraux favorisant la croissance du B. Coli. Ils ajoutèrent en quantités diverses les éléments étudiés à un milieu synthétique de base composé de ClNa (0,5 %), SO^4 $(NH^4)^2$ (0,8 %), PO^4 KH^2 et PO^4Na^2H (0,2 %), glycérol (3 %), pH = 6,8. Ils ont constaté que les seuls éléments minéraux dont l'addition à leur milieu provoquait une notable augmentation de la croissance était le magnésium et le fer (ce dernier à un degré moindre). Par contre, les éléments suivants n'ont produit aucun effet supplémentaire sur la croissance : Ca, Sr, Ru, Cae, Cu, Al, silicate de soude, Zn, Co, Mn, Ni. L'addition de Zn, Co, Ni, Mn au milieu additionné de Mg a même produit une inhibition de la croissance.

Remarquons à ce sujet, qu'en 1934, A. Berthelot (9) avait pourtant écrit : « La formule de nombreux milieux synthétiques comporte un sel de fer et il est souvent avantageux de substituer à celui-ci un mélange, en proportions convenables, de composés de Fe, Mn, Ca, Co, Ni, Ti, Zn, Cu, Gl et B, et apportés par une solution complexe. »

Sans doute faut-il voir dans ces faits une modifica-

tion de l'action des ions Zn, Co, Ni, Mn dans la solution de Berthelot, modification due à la complexité même de cette solution.

En tout cas, il faut noter que la plupart des milieux synthétiques proposés pour cultiver le Colibacille contiennent invariablement un sel de magnésium jouant le rôle de stimulant, un glucide ou un acide organique comme source de carbone énergétique et un sel d'ammonium, générateur d'azote.

Signalons enfin que tout récemment, A. Sartory et J. Meyer (77), au cours d'une étude sur le développement du Colibacille dans un milieu synthétique ammoniacal, ont confirmé l'aptitude de ce bacille à assimiler l'azote des sels ammoniacaux.

Pour notre part, nous avons adopté comme milieux synthétiques : pour étudier le Staphylocoque doré, le milieu proposé par Ramon, Boivin et Richou (66) et pour cultiver le Colibacille le milieu de Péré (64), dont nous donnerons plus loin les formules (v. pages 41 et 77).

B

Essais personnels.

Les faits ci-dessus mentionnés nous ont amené à utiliser, pour l'étude de la multiplication du Staphylocoque doré en milieu synthétique, un milieu à base d'acides aminés, de sels minéraux et de glucose, auquel ont été ajoutés, comme facteurs de croissance, de l'acide nicotinique et de l'aneurine.

Milieux Utilisés.

a) *Milieu synthétique.* Le milieu synthétique employé était celui préconisé par Ramon, Boivin et Richou (66), et préparé de la façon suivante :

— On faisait dissoudre à chaud : 15 grammes de gélatine dans 100 cc. d'acide sulfurique 2N (dilué au 1/10e environ). La solution était chauffée pendant trois heures à l'autoclave, sous 2 kg. de pression. (Toutes les chaînes polypeptidiques étaient brisées et les acides aminés libérés). L'acide sulfurique en excès était neutralisé par la baryte, en évitant soigneusement tout excès de ce réactif. Après filtration, on ajoutait à l'hydrolysat les corps suivants :

Tyrosine	0 gr. 10
Cystine	0 — 10
Tryptophane	0 — 05
Phosphate monopotassique . . .	7 —
Citrate trisodique	5 —
Eau distillée q.s.p.	1.000 cc.

Cette solution était ajustée à pH 7,4, et stérilisée à l'autoclave à 110° pendant vingt minutes.

— D'autre part, on faisait dissoudre dans 20 cc. d'eau distillée :

Glucose	4 gr.
Sulfate de magnésie	0 — 10
Acide nicotinique	0 — 001
Aneurine	1/20 de mgr.

Cette deuxième solution était stérilisée à 110° pendant vingt minutes. On réunissait ensuite aseptiquement les deux solutions ci-dessus.

b) *Milieu naturel.* Le milieu naturel était constitué par du bouillon de viande de formule courante, c'est-à-dire à base de : viande de bœuf (500 gr. 0/00), peptone (20 gr. 0/00), NaCl (5 gr. 0/00), et ajusté à pH 7,0. Le bouillon ainsi préparé était porté à l'autoclave à 120° pendant quinze minutes pour précipiter les sels terreux. Au sortir de l'autoclave, ce bouillon était filtré sur un filtre chardin ébouillanté, puis réparti en ballons, et stérilisé durant vingt minutes à 115°.

Souche Employée.

Nous avons effectué nos essais avec une souche de Staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus* +) provenant du Laboratoire de Travaux Pratiques de Bactériologie de la Faculté de Pharmacie de Paris, conservée au frais en gélatine nutritive, et réensemencée périodiquement sur gélose inclinée.

Essais Réalisés.

En vue de suivre la multiplication du Staphylocoque simultanément en milieu synthétique et en bouillon de viande, nous avons effectué neuf séries d'essais, dont cinq ont été réalisées en milieu synthétique, et quatre en bouillon de viande.

Le premier essai a été fait en milieu synthétique dans le but de vérifier la bonne multiplication de notre souche dans ce milieu. La numération a été faite par la méthode des plaques de gélose.

Dans les quatre séries d'essais suivantes, nous avons

étudié la multiplication, comparativement en milieu synthétique et en bouillon de viande, par la méthode de numération sur plaques de gélose.

Dans les deux autres séries d'essais, nous avons suivi le développement du Staphylocoque, comparativement en milieu synthétique et en bouillon de viande, par la méthode de pesée après filtration sur creusets d'Iéna.

Dans les deux dernières séries d'essais, nous avons employé simultanément la méthode de pesée et la méthode de numération sur plaques de gélose pour les deux milieux de culture.

Nous ne reviendrons pas sur la description détaillée de nos techniques d'essai, déjà présentée au premier chapitre (v. page 20).

Nous rappelons seulement que les opérations de numération ou de pesée ont été effectuées en double, aux différentes heures de culture, et que nos résultats représentent la moyenne des valeurs trouvées au cours de ces deux mesures.

Résultats Obtenus.

Nous présentons les résultats obtenus sous forme de tableaux. Dans ces tableaux, nous avons indiqué, pour les diverses heures de culture, les résultats obtenus au cours des numérations, et nous les avons exprimés en nombre de microbes par centimètre cube de milieu de culture; les résultats obtenus par pesée ont été exprimés en milligramme de masse microbienne pour un centimètre cube de milieu de culture.

Afin de rendre ces résultats plus apparents, nous les avons portés sous forme de courbes. Les chiffres exprimant les poids, et surtout ceux exprimant les nombres des microbes, présentaient entre eux des écarts si grands qu'il nous était impossible de les faire figurer sur une même courbe. Nous avons donc construit ces courbes, non pas d'après les nombres ou les poids des germes, mais d'après les logarithmes des nombres, et

les logarithmes des poids exprimés en millièmes de milligrammes.

Dans le tableau I, nous avons reporté les résultats de l'essai n° 1, effectué en milieu synthétique, dans lequel l'accroissement du Staphylocoque a été suivi par la méthode de numération sur plaques de gélose. La courbe correspondant à ces résultats est représentée dans la figure 1.

Dans le tableau II, nous avons reporté les résultats des séries d'essais n°s 2 et 3, effectuées respectivement en milieu synthétique et en bouillon de viande, par la méthode de numération sur plaques de gélose. Les courbes correspondantes sont représentées dans la figure 2.

Dans le tableau III, nous avons reporté les résultats des séries d'essais n°s 4 et 5, effectuées dans les mêmes milieux et par la même méthode que précédemment. Les courbes correspondantes sont représentées dans la figure 3.

Dans le tableau IV, nous avons reporté les résultats des séries d'essais n°s 6 et 7 effectuées respectivement en milieu synthétique et en bouillon de viande, par la méthode de pesée après filtration sur creusets d'Iéna. Les courbes correspondantes sont représentées dans la figure 4.

Dans les tableaux V et VI, nous avons successivement reporté les résultats des séries d'essais n°s 8 et 9, effectuées respectivement en milieu synthétique et en bouillon de viande, en utilisant simultanément la méthode de pesée après filtration sur creusets d'Iéna et la méthode de numération sur plaques de gélose. Les courbes correspondantes sont respectivement représentées dans les figures 5 et 6.

TABLEAU I

Multiplication du Staphylocoque doré en milieu synthétique. Numération par la méthode des plaques de gélose.

ESSAI 1

Heures de culture à 37°	Nombres de germes par cc	Logarithmes
0	12.000	4,08
3 h. 30	20.000	4,30
5 h. 30	620.000	5.79
7 h. 30	1.710.000	6,23
24	47.000.000	7,67
48	153.000.000	8,18

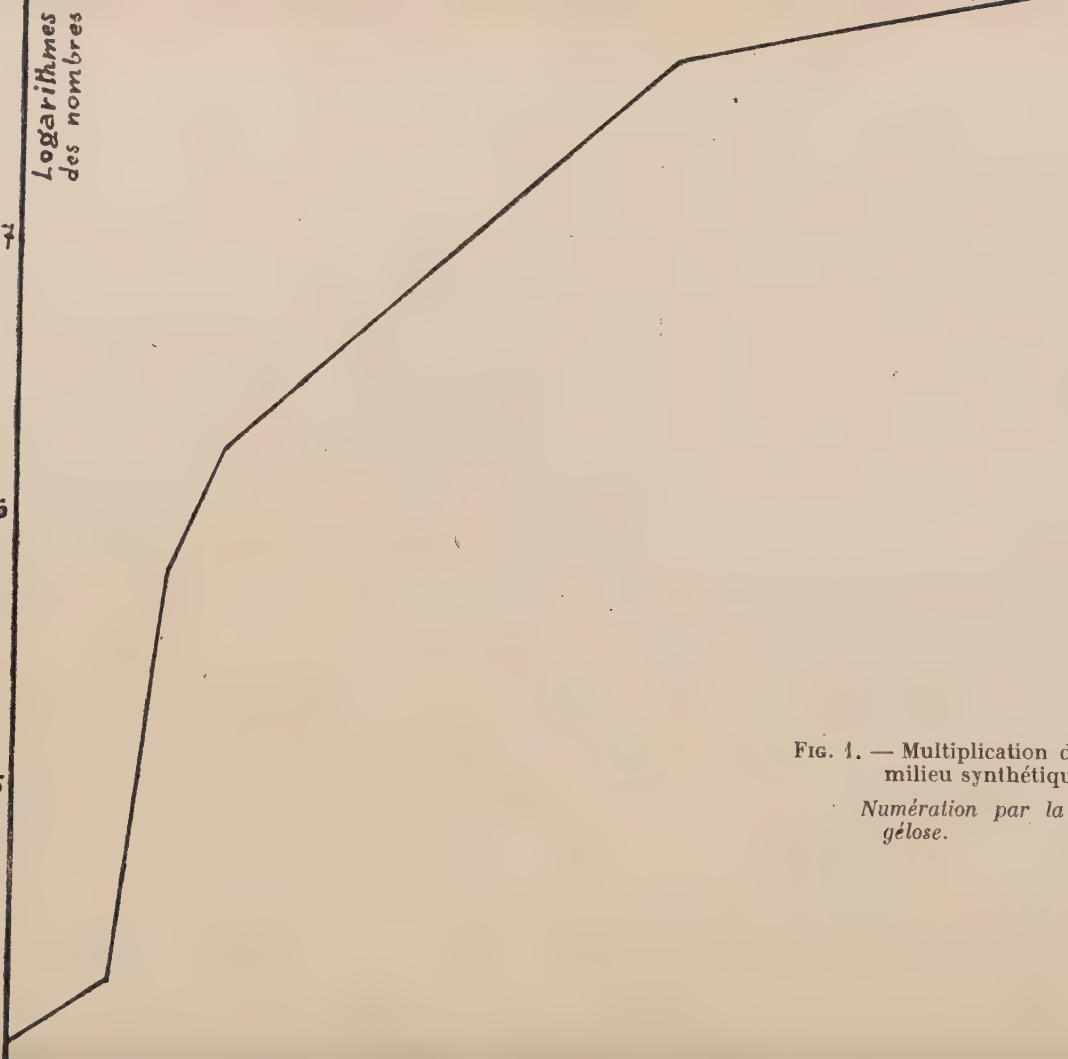


FIG. 1. — Multiplication du Staphylocoque doré en milieu synthétique.

Numération par la méthode des plaques de gélose.

TABLEAU II

Multiplication du Staphylocoque doré en milieu synthétique et en bouillon de viande. Numération par la méthode des plaques de gélose.

Heures de culture à 37°	ESSAI 2 En mileu synthétique		ESSAI 3 En bouillon de viande	
	Nombres de germes par cc	Loga-rithmes	Nombres de germes par cc	Loga-rithmes
0	1.180.000	6,07	750.000	5,88
2	1.230.000	6,09	1.430.000	6,15
4 h. 30	2.222.000	6,35	5.180.000	6,71
6	4.300.000	6,53	32.000.000	7,51
8	25.000.000	7,40	315.000.000	8,51
24	76.000.000	7,88	877.000.000	8,94
48	300.000.000	8,48	1.180.000.000	9,07
6e Jour	355.000.000	8,55	1.370.000 000	9,13
8e J.	441.000.000	8,64	1.400.000.000	9,15

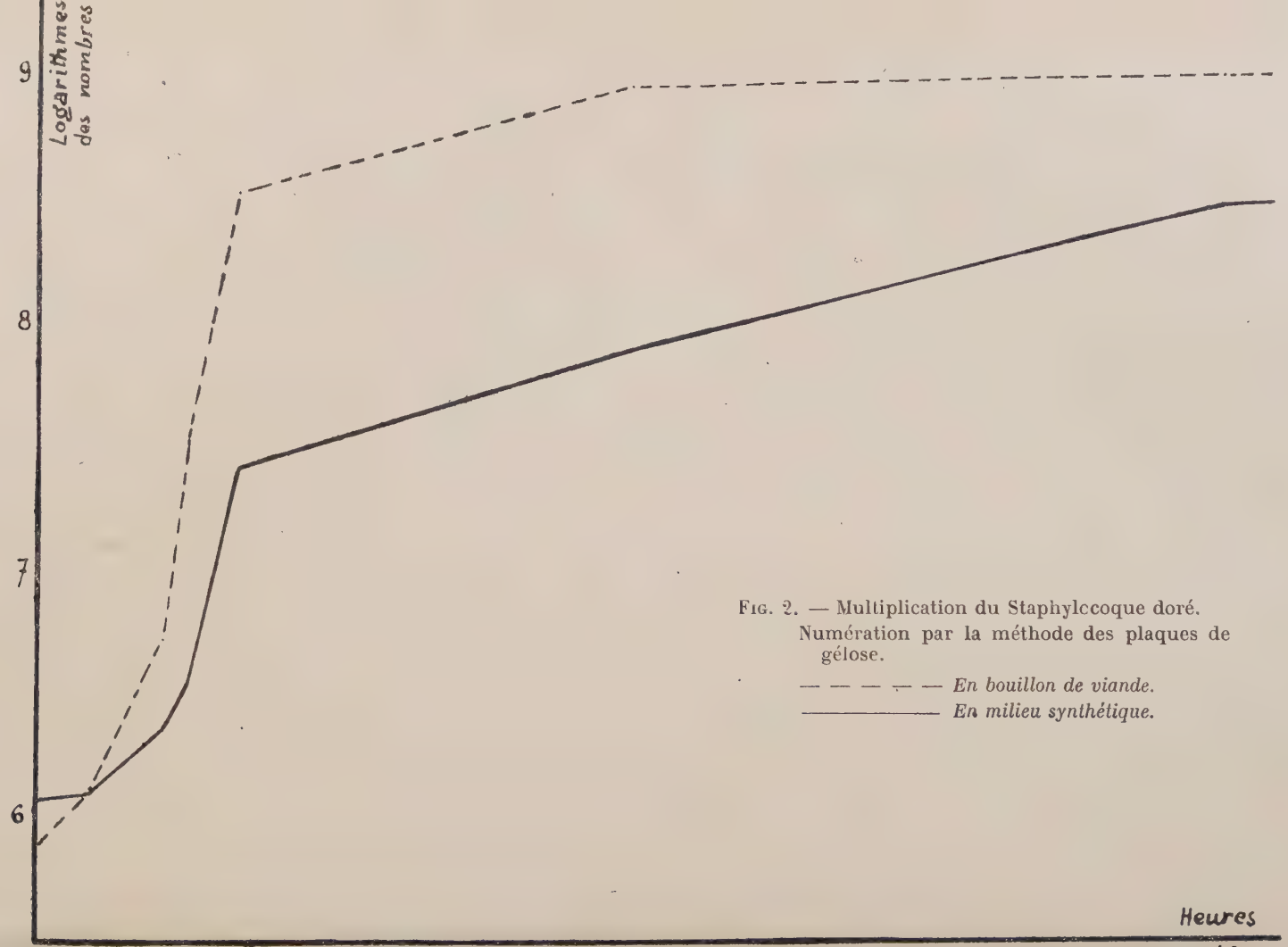


Fig. 2. — Multiplication du Staphylcoque doré. Numération par la méthode des plaques de gélose.

— — — — — — *En bouillon de viande.*

———————— *En milieu synthétique.*

TABLEAU III

Multiplication du Staphylocoque doré en milieu synthétique et en bouillon de viande. Numération par la méthode des plaques de gélose.

Heures de culture à 37°	ESSAI 4 En milieu synthétique		ESSAI 5 En bouillon de viande	
	Nombres de germes par cc	Logarithmes	Nombres de germes par cc	Logarithmes
0	850.000	5,93	850.000	5,93
2	1.000.000	6,00	1.860.000	6,27
4	2.020.000	6,30	10.000.000	7 00
6	6.400.000	6,81	71.000.000	7,85
8	36.600.600	7,56	320.000.000	8,50
24	100.000.000	8,00	800.000.000	8,90
48	320.000.000	8,50	960.000.000	8,98
4e Jour	325.000.000	8,51	1.030.000.000	9,01
6e J.	327.000.000	8,51	1.130.000.000	9,05
16e J.	140.000.000	8,15	34.000.000	7,53

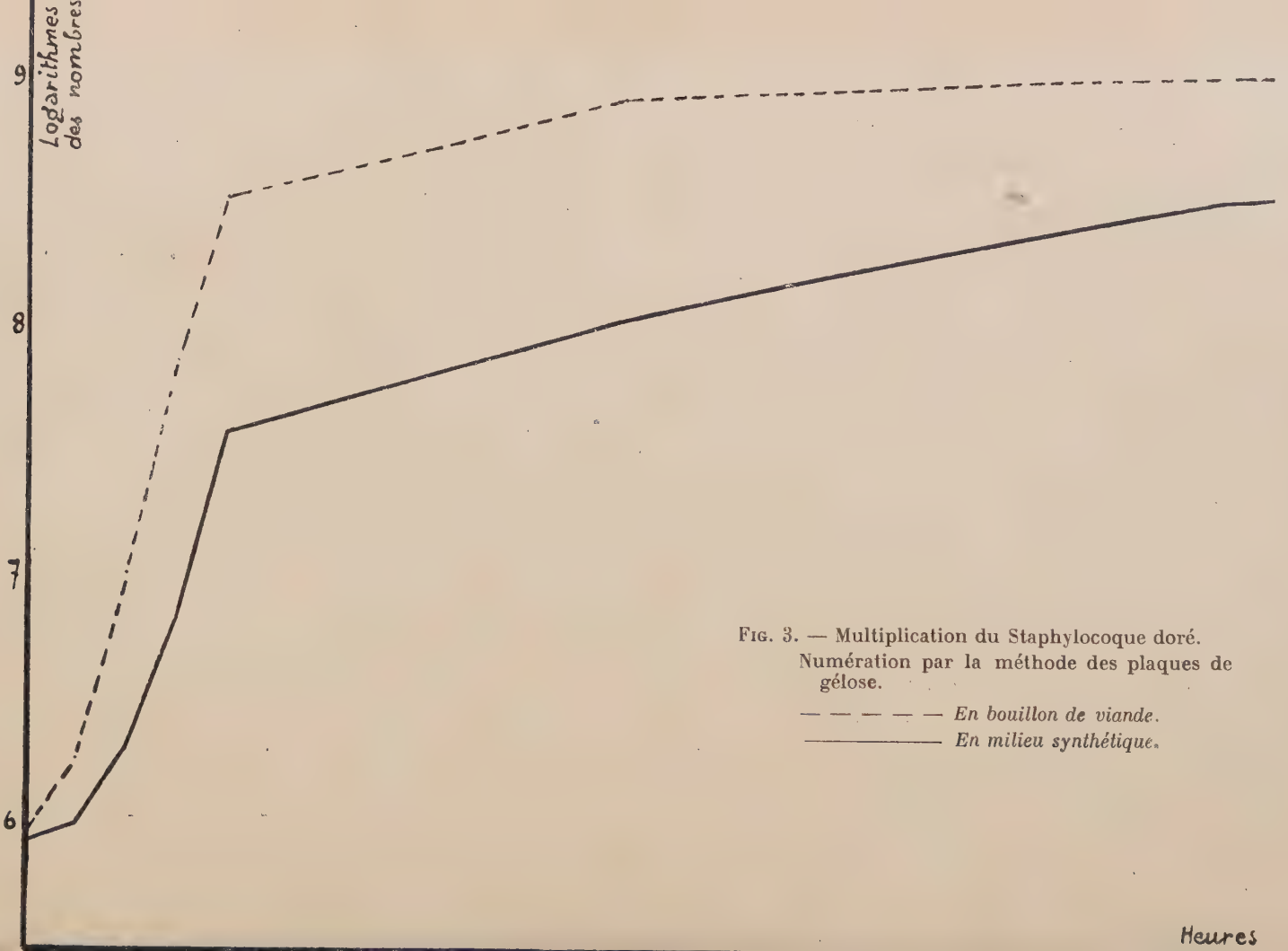


Fig. 3. — Multiplication du Staphylocoque doré. Numération par la méthode des plaques de gélose.

— — — — — *En bouillon de viande.*

———— *En milieu synthétique.*

TABLEAU IV

Multiplication du Staphylocoque doré en milieu synthétique et en bouillon de viande. Pesée après filtration sur creusets d'Iéna.

Heures de culture à 37°	ESSAI 6 En milieu synthétique		ESSAI 7 En bouillon de viande	
	Poids en mgrs rapportés à 1 cc de culture	Logarithmes des 1/1000e de mgr	Poids en mgrs rapportés à 1 cc de culture	Logarithmes des 1/1000e de mgr
0	0,0025	0,40	0,0025	0,40
2	0,025	1,40	0,030	1,47
5	0,030	1,47	0,124	2,09
7	0,080	1,90	0,195	2,29
24	0,804	2,90	0,900	2,95
48	0,869	2,94	0,993	2,99
4e Jour	1,050	3,02	1,161	3,06
7e J.	1,329	3,12	1,505	3,18
14e J.	1,727	3,24	2,364	3,37

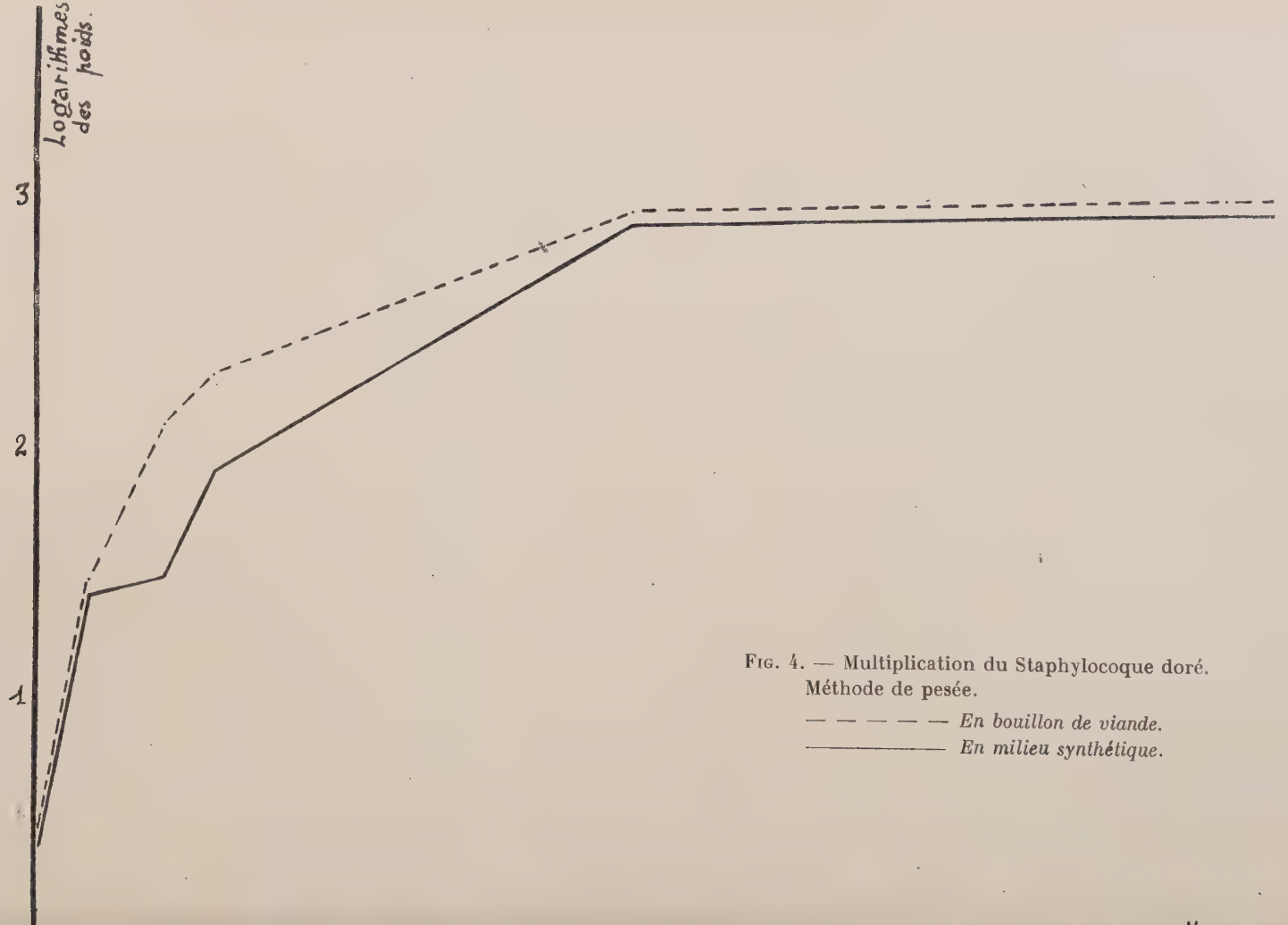


FIG. 4. — Multiplication du Staphylocoque doré.
Méthode de pesée.

— — — — — *En bouillon de viande.*

———— *En milieu synthétique.*

TABLEAU V

Multiplication du Staphylocoque doré en milieu synthétique.

Pesée après filtration sur creusets d'Iéna.

Et numération par la méthode des plaques de gélose.

(ESSAI 8)

Heures de culture à 37°	PESÉE		NUMÉRATION	
	Poids en mgrs rapportés à 1 cc de culture	Logarithmes des 1/1.000e de mgr	Nombres de germes par cc	Logarithmes
0	0,002	0,30	500.000	5,70
2	0,025	1,40	550.000	5,74
5	0,032	1,50	600.000	5,78
8	0,075	1,87	1.800.000	6,25
24	0,919	2,96	120.000.000	8,08
48	1,100	3,04	175.000.000	8,24
4e Jour	1,317	3,12	200.000.000	8,30
7e J.	1,375	3,14	200.000.000	8,30
14e J.	1,425	3,15	95.000.000	7,98

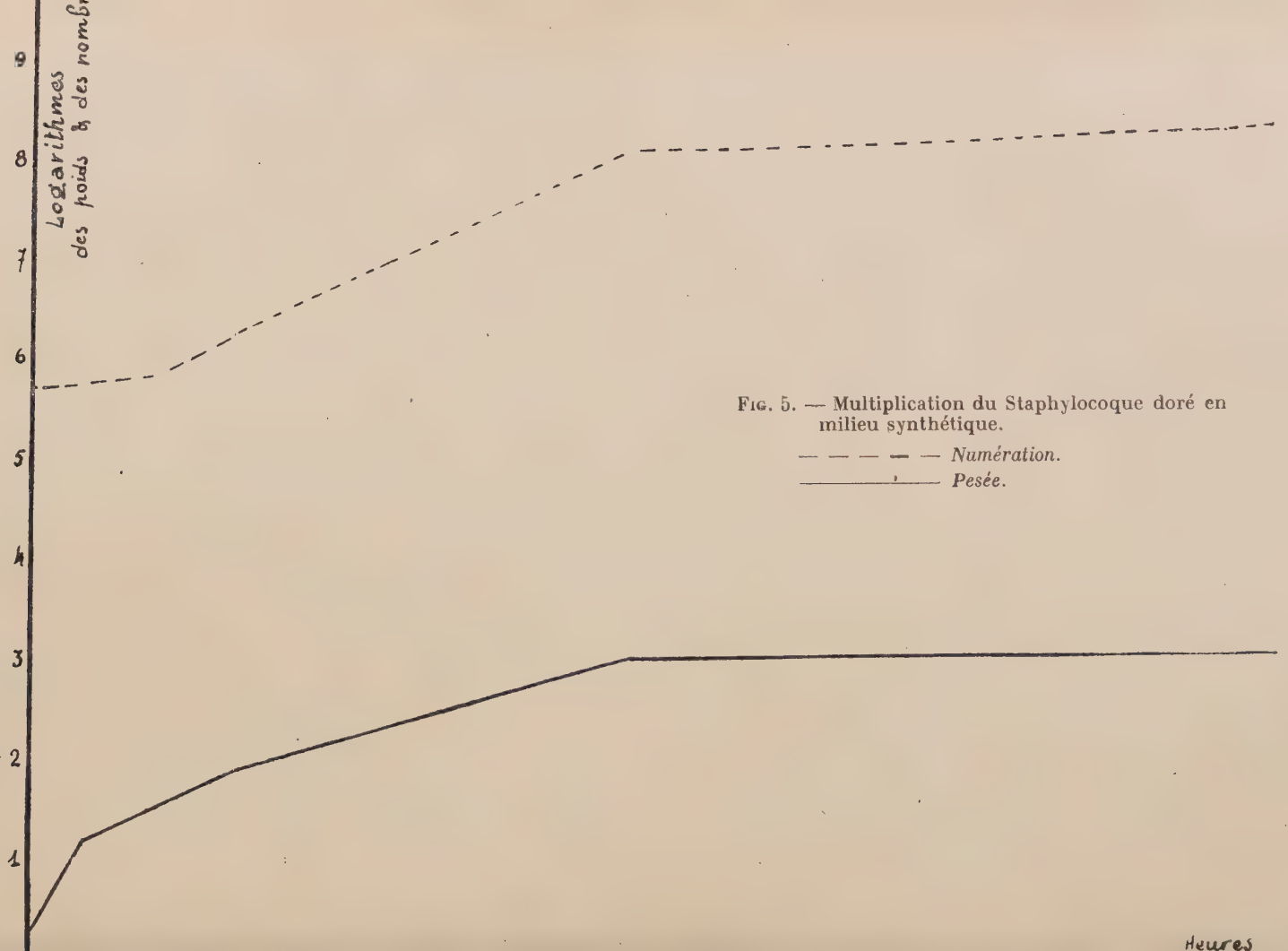


Fig. 5. — Multiplication du Staphylocoque doré en milieu synthétique.

— — — — — *Numération.*

———— *Pesée.*

TABLEAU VI

Multiplication du Staphylocoque doré en bouillon de viande.

Pesée après filtration sur creusets d'Iéna. Et numération par la méthode des plaques de gélose.

(ESSAI 9)

Heures de culture à 37°	PESÉE		NUMÉRATION	
	Poids en mgrs rapportés à 1 cc de culture	Logarithmes des 1/1000e de mgr	Nombres de germes par cc	Logarithmes
0	0,0022	0,30	800.000	5,90
2	0,028	1,45	1.000.000	6,00
5	0,099	1,99	63.000.000	7,80
8	0,177	2,24	120.000.000	8,08
24	1,023	3,01	1.180.000.000	9,25
48	1,481	3,17	1.900.000.000	9,27
4e Jour	1,658	3,22	2.000.000.000	9,30
7e J.	1,735	3,24	2.040.000.000	9,31
14e J.	1,891	3,28	80.000.000	7,90

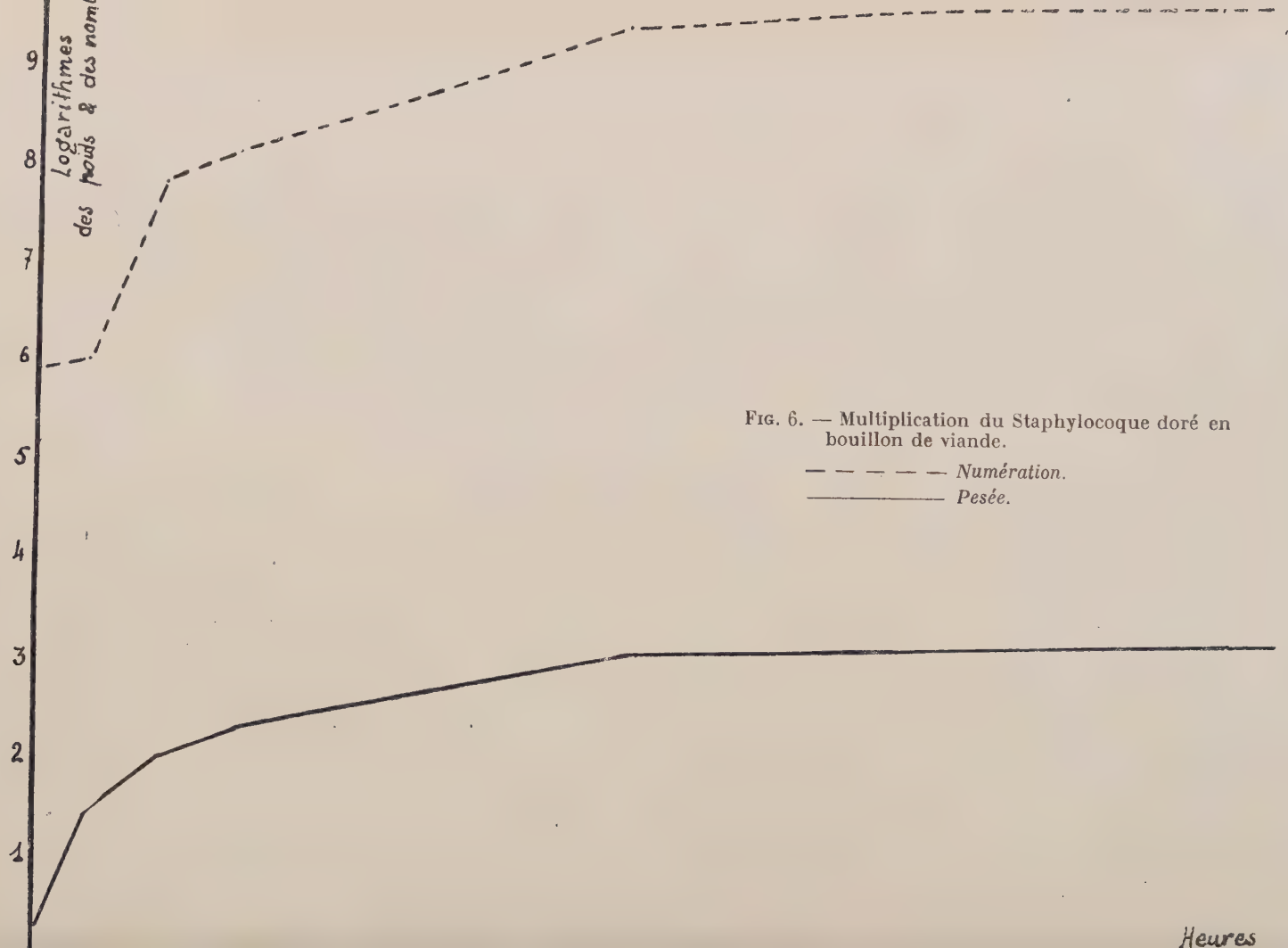


FIG. 6. — Multiplication du Staphylocoque doré en bouillon de viande.

— — — — — *Numération.*

———————— *Pesée.*

Discussion des Résultats obtenus.

1° Résultats obtenus dans l'étude de la multiplication du staphylocoque doré, cultivé d'une part en milieu synthétique et d'autre part en bouillon de viande, par dénombrement des bactéries sur plaques de gélose.

Si nous suivons le développement du Staphylocoque doré par la méthode de numération sur plaques de gélose, nous constatons, en examinant les tableaux et les courbes établis précédemment, que la multiplication, d'une manière générale, présentait les mêmes caractères dans les deux milieux utilisés. Nous observons les phases normales de développement, à savoir :

Une phase de latence,
Une phase de multiplication logarithmique,
Une phase de multiplication ralentie,
Une phase de maximum stationnaire,
Une phase de déclin.

Ces phases cependant, présentaient quelques divergences dans les deux milieux. Elles variaient de l'un à l'autre milieu, soit dans leur durée, soit dans la vitesse de multiplication des microbes, soit dans leur vitesse de destruction.

La *phase de latence était plus longue dans le milieu synthétique que dans le bouillon de viande.* Elle s'arrêtait à la deuxième heure dans ce dernier milieu, alors que dans le milieu synthétique elle se prolongeait jusqu'à la quatrième ou cinquième heure. Ceci semble indiquer que le Staphylocoque avait plus de difficultés à s'adapter au milieu synthétique qu'au bouillon de viande. Ces difficultés d'adaptation seraient-elles dues

à l'insuffisance — qualitative ou quantitative — de facteurs de départ? facteurs dont nous avons parlé plus haut (v. p. 35) ou bien à la présence de petites quantités de substances toxiques dans le milieu synthétique ?

L'hypothèse d'une mauvaise adaptation au milieu semble trouver une confirmation dans les observations morphologiques faites au sujet du B. Coli (v. page 115). Nous verrons en effet que ce germe, transporté dans un milieu synthétique, commençait d'abord par se « ratatiner », alors qu'il restait sans changement quand nous le transportions dans le bouillon de viande.

Signalons que R. David (21) en 1931, au cours de l'étude numérique de la multiplication du bacille Pyocyanique dans différents milieux de culture liquide, avait observé aussi cet allongement de la phase de latence lorsqu'il utilisait les milieux synthétiques de Liot et de Aubel.

J. Monod (59), en 1942, put également observer cette différence de durée de la phase de latence en cultivant le B. Subtilis dans un milieu naturel à base de bouillon de cervelle de veau, et dans un milieu synthétique constitué par une solution aqueuse de saccharose, PO^4KH^2, NH^4Cl, SO^4Mg, SO^4Fe, $CaCl^2$. Le temps de latence, à peine de deux heures dans le premier milieu, durait près de quatre heures dans le milieu synthétique. D'après cet auteur, « la nature du milieu ensemencé joue un rôle important dans la durée du temps de latence, et cela, même lorsqu'on ensemence des souches déjà longuement accoutumées au milieu envisagé ». Il suppose que les milieux synthétiques contiennent de faibles doses de substances toxiques. « La croissance au taux maximum ne pourrait s'établir qu'une fois cet effet toxique neutralisé. Il est probable que les substances toxiques en cause sont des ions métalliques présents à l'état de traces. » D'autre part, « les milieux naturels contiennent nécessairement beaucoup moins d'impuretés métalliques que les milieux synthétiques...

Ils sont colloïdaux, et les colloïdes doivent jouer vis-à-vis des ions toxiques un rôle protecteur ».

La *phase de multiplication logarithmique* était plus tardive dans le milieu synthétique que dans le bouillon de viande. Elle débutait à la deuxième heure dans ce dernier milieu, et n'apparaissait qu'à la quatrième ou cinquième heure dans le premier.

Cette phase était d'autre part moins accentuée dans le milieu synthétique que dans le bouillon de viande où le nombre de germes développés à la fin de cette période était nettement plus grand.

En effet, vers la huitième heure, c'est-à-dire vers la fin de la phase logarithmique, nous avions, par exemple, dans les essais n^{os} 4 et 5, respectivement 36 millions 600.000 germes par centimètre cube de milieu synthétique, et 320 millions de germes par centimètre cube de bouillon de viande (Tableau III).

Dans les essais n^{os} 2 et 3, nous avions respectivement 25 millions et 315 millions de germes (Tableau II).

Dans les essais n^{os} 8 et 9, nous avions respectivement 1 million 800.000 et 120 millions de germes (Tableaux V et VI).

Or les nombres des germes ensemencés au départ étaient :

— égaux dans les deux milieux, pour les essais n^{os} 4 et 5 (850.000 germes par centimètre cube).

— plus forts en milieu synthétique qu'en bouillon de viande, dans les essais n^{os} 2 et 3 (respectivement 1 million 180.000 et 750.000 germes par centimètre cube).

— plus faibles en milieu synthétique qu'en bouillon de viande, dans les essais n^{os} 8 et 9 (respectivement 500.000 et 800.000 germes par centimètre cube).

Donc, dans tous les cas, pendant la phase logarithmique, la multiplication du Staphylocoque s'est montrée nettement plus lente dans le milieu synthétique utilisé que dans le bouillon de viande.

La phase suivante, dite *phase de multiplication ralentie,* commençait pour les deux milieux vers la huitième heure et se prolongeait jusqu'à la quarante-huitième heure.

Contrairement à ce qui se passait pendant la phase logarithmique, la multiplication, bien que ralentie, restait ici légèrement plus active en milieu synthétique qu'en bouillon de viande. Considérons à titre d'exemple nos essais n°ˢ 4 et 5 (Tableau III).

A la huitième heure, c'est-à-dire au début de la phase de multiplication ralentie, nous avions 36.000.000 de germes par centimètre cube en milieu synthétique, contre 320.000.000 de germes par centimètre cube en bouillon de viande. Nous avions donc $\frac{320.000.000}{36.000.000} = 9$ fois plus de germes environ dans ce dernier milieu.

A la quarante-huitième heure, c'est-à-dire vers la fin de la phase de multiplication ralentie, les nombres des germes en bouillon de viande et en milieu synthétique ne nous donnaient plus qu'un rapport égal à

$$\frac{960.000.000}{320.000.000} = 3.$$

Au cours de ces essais, la multiplication était donc trois fois plus intense en milieu synthétique qu'en bouillon de viande entre la huitième et la quarante-huitième heure de culture.

Comment expliquer cette différence de comportement des bactéries dans les deux milieux, à partir de la huitième heure ?

Deux hypothèses peuvent être retenues, qui d'ailleurs dépendent l'une de l'autre :

La première serait l'accumulation possible d'une quantité de produits du métabolisme plus grande dans le bouillon de viande qu'en milieu synthétique, du fait d'une multiplication beaucoup plus active dans le pre-

mier milieu au cours des huit premières heures de culture. Cette hypothèse trouve sa confirmation dans les conclusions de Eijkmann (22), Conradi et Kurpjeweit (20) et Alan Mac Chesney (17) qui voient dans l'accumulation des produits du métabolisme le facteur essentiel limitant la multiplication cellulaire.

La seconde, si l'on se range à l'avis de Monod (59), pour lequel la croissance serait limitée surtout par l'appauvrissement en aliments du milieu, nous inciterait à penser que la multiplication, active au départ en bouillon de viande, épuise plus rapidement ce milieu que le milieu synthétique, lequel conserverait alors plus longtemps son pouvoir nutritif.

Malgré le rythme de croissance plus rapide observé en milieu synthétique à partir de la huitième heure, le nombre de microbes dans ce milieu restait toujours nettement inférieur à celui qui était observé en bouillon de viande, vers la fin de la phase de multiplication ralentie.

Nous avions en effet, à la quarante-huitième heure, dans les essais réalisés en milieu synthétique, respectivement : 300, 320, 175 millions de germes par centimètre cube (Essais n^{os} 2, 4, 8. Tableaux II, III, V), et à la même heure, dans les essais effectués en bouillon de viande, nous obtenions respectivement : 1 milliard 180 millions, 960 millions et 1 milliard 900 millons de germes par centimètre cube. (Essais n^{os} 3, 5, 9. Tableaux II, III, VI.)

En conséquence, le maximum atteint était aussi plus faible en milieu synthétique qu'en bouillon de viande. Il variait entre 200 et 400 millions de germes par centimètre cube dans les essais effectués en milieu synthétique; il était de l'ordre de 1 à 2 milliards dans les essais réalisés en bouillon de viande.

La *phase de maximum stationnaire* se prolongeait pendant quelques jours; puis venait la *phase de déclin* dans laquelle le rythme de destruction des bactéries était plus rapide en bouillon de viande qu'en milieu

synthétique. C'est ainsi que dans les essais n[os] 4 et 5 (Tableau III), par exemple, au seizième jour, alors qu'il restait encore 140 millions de germes par centimètre cube dans le milieu synthétique, il n'en restait plus que 34 millions dans le bouillon de viande, bien que le maximum atteint ait été plus élevé dans ce dernier milieu.

Il semble donc que le Staphylocoque ait eu alors une vitalité plus longue dans le milieu synthétique que dans le bouillon de viande.

Ici encore, ce fait pourrait être dû à un épuisement plus lent des matières nutritives dans le milieu synthétique, ou bien au manque d'espace vital causé par l'accumulation d'un plus grand nombre de germes et de leurs produits du métabolisme dans le milieu naturel.

2° Résultats obtenus dans l'étude de la multiplication du staphylocoque doré, cultivé d'une part en milieu synthétique et d'autre part en bouillon de viande, par la méthode de pesée.

Nous allons examiner maintenant l'accroissement non plus des seules bactéries « vivantes », capables de se reproduire après transport sur un milieu neuf gélosé, et d'y être dénombrées, mais de la totalité des bactéries, vivantes ou non, dont nous avons noté la masse, par pesée.

L'examen des tableaux présentés plus haut (Tableaux IV, V, VI) et des courbes correspondantes (Figures 4, 5, 6) nous a permis de constater que les variations de poids des microbes développés aux différentes heures de culture n'étaient pas parallèles aux variations de leurs nombres. Les phases de latence et de déclin ne se retrouveraient pas par la méthode de pesée. Celle-ci nous a permis d'observer seulement trois phases :

— une phase d'augmentation pondérale marquée;
— une phase d'augmentation pondérale faible;
— une phase de maximum stationnaire.

Il est intéressant de remarquer que l'absence de la phase de latence observée par pesée était constatée également lorsqu'on suivait le développement des cultures par la méthode de numération microscopique indirecte de Wright-Fries. Rappelons à ce sujet, les travaux antérieurement entrepris par J. Régnier et S. Lambin (70), et R. David (21). Ces auteurs, étudiant la multiplication du bacille Pyocyanique en bouillon de viande, et dénombrant les germes simultanément par la méthode des plaques de gélose et par la méthode microscopique indirecte de Wright-Fries, constatèrent par la première technique l'existence d'une phase de latence, due au fait que seuls étaient capables de survivre au transport dans un milieu neuf, les microbes assez résistants pour s'adapter à ce nouveau milieu. Mais dénombrant par la seconde technique la totalité des germes, capables ou non de s'adapter à un nouveau milieu, ils n'avaient pu retrouver cette phase de latence.

Or, lorsque nous pesions les masses microbiennes, c'était aussi le poids de tous les microbes, capables ou non de s'adapter à un nouveau milieu, qui entrait en jeu, Il ne nous semble donc pas surprenant que nous n'ayons pas remarqué de phase de latence en utilisant la technique de pesée.

Mais d'autre part, la question d'adaptation microbienne au milieu synthétique n'influait-elle pas sur l'augmentation pondérale ? Il semble qu'une partie des bactéries (les plus résistantes) puisse se développer dès le départ de la culture. Il s'agirait d'une proportion faible de germes, incapables d'entraîner des modifications notables aux numérations sur plaques de gélose, mais capables de contribuer à une augmentation pondérale appréciable, étant les plus résistants, et peut-être les plus lourds.

La *phase d'augmentation pondérale marquée* commençait donc immédiatement après l'ensemencement. Elle durait jusqu'à la deuxième heure seulement dans le milieu synthétique, et se prolongeait jusqu'à la cinquième heure dans le bouillon de viande. Les poids des microbes rapportés à un centimètre cube de culture, au départ (Heure 0), à la deuxième heure et à la cinquième heure, étaient, dans deux essais différents en milieu synthétique, respectivement de :

H 0.	2e H.	5e H.
0 mgr 0025	0 mgr 025	0 mgr 030 (Essai 6. Tableau IV)
0 mgr 002	0 mgr 025	0 mgr 032 (Essai 8. Tableau V)

et en bouillon de viande :

H 0.	2e H.	5e H.
0 mgr 0025	0 mgr 03	0 mgr 124 (Essai 7. Tableau IV)
0 mgr 0022	0 mgr 028	0 mgr 099 (Essai 9. Tableau VI)

Nous remarquons que, dans les deux millieux, les poids microbiens obtenus à la deuxième heure de culture étaient dix fois plus grands que les poids initiaux.

Entre la deuxième et la cinquième heure de culture, se montrait déjà une divergence : les poids bactériens entre ces deux temps augmentaient en effet dans le rapport de 1 à 4 pour les cultures en bouillon de viande, alors qu'ils n'augmentaient que dans le rapport de 1 à 1,5 en milieu synthétique. On observait donc déjà dans cette période, un ralentissement du taux d'accroissement dans les cultures en milieu synthétique.

Nous pouvons donc dire que dans ces essais, la phase d'augmentation pondérale marquée se prolongeait davantage en bouillon de viande.

D'autre part, le rythme d'augmentation des poids était aussi plus accentué dans le bouillon de viande. Nous venons de voir la différence des augmentations pondérales dans les deux milieux entre la deuxième et la cinquième heure de culture.

Il en avait été de même entre l'heure initiale et la deuxième heure. En effet, les rapports des poids obser-

vés à la deuxième heure et à l'heure initiale étaient respectivement dans les essais n°s 6 et 8 en milieu synthétique, de :

$$\frac{0,025}{0,0025} \text{ et } \frac{0,025}{0,002}$$

et en bouillon de viande (Essais n°s 7 et 9) :

$$\frac{0,03}{0,0025} \text{ et } \frac{0,028}{0,0022}$$

Nous remarquons que les derniers rapports sont respectivement un peu plus grands que les premiers.

Cette différence dans le rythme des augmentations des poids dans les deux milieux de culture s'observait également dans la *phase d'augmentation pondérale faible.*

Celle-ci était plus longue que la phase précédente. Elle durait dans les deux milieux jusqu'à la quarante-huitième heure de culture. Mais si l'augmentation pondérale dans les deux milieux restait encore assez appréciable entre la cinquième et la vingt-quatrième heure, elle devenait très faible entre la vingt-quatrième et la quarante-huitième heure.

En effet, les rapports des poids observés à la vingt-quatrième et à la cinquième heure de culture étaient respectivement de :

$$\frac{0,804}{0,03} \text{ et } \frac{0,919}{0,032} (= 30 \text{ environ})$$

dans les essais n°s 6 et 8 effectués en milieu synthétique (Tableaux IV et V);

et de : $\frac{0,900}{0,124}$ et $\frac{1,023}{0,099}$ (= 10 environ)

dans les essais n°s 7 et 9 effectués en bouillon de viande (Tableaux IV et VI).

Et les rapports des poids observés à la 48e et à la 24e heure de culture étaient respectivement de :

$$\frac{0,869}{0,804} \text{ et } \frac{1,10}{0,919} (= 1 \text{ environ})$$

dans les mêmes essais réalisés en milieu synthétiques ;

et de : $\frac{0,993}{0,900}$ et $\frac{1.481}{1,023}$ (= 1 environ)

dans les mêmes essais réalisés en bouillon de viande.

Nous remarquons que les rapports des poids observés à la vingt-quatrième et à la cinquième heure en milieu synthétique sont plus grands que ceux observés aux mêmes heures en bouillon de viande. L'augmentation pondérale était donc ici plus faible dans ce dernier milieu qu'en milieu synthétique.

Passée cette phase, nous n'avons pu observer de phase de *maximum stationnaire* proprement dite, mais l'augmentation pondérale était devenue si faible que nous pouvions la considérer comme stationnaire.

Nous n'avons pu observer davantage de phase de déclin. Ceci ne saurait d'ailleurs nous étonner beaucoup car notre méthode de pesée ne nous permettait pas de séparer les bactéries plus ou moins lysées qui venaient ajouter leur poids propre à celui des germes.

Nous devons mentionner que D. Bach (4), dans une expérience analogue, avait observé les phases de latence et de déclin. Si sa phase de latence était assez nette, sa phase de déclin l'était beaucoup moins, les poids microbiens, à la fin de son expérience, étaient en effet encore assez élevés par rapport au poids maximum atteint.

Nous sommes néanmoins du même avis que cet auteur quant à la différence profonde qui existait entre le rythme de l'augmentation du nombre des microbes et le rythme de l'augmentation de leurs poids. Nous examinerons de près cette question dans le paragraphe suivant.

3° Comparaison des résultats fournis par les méthodes de numération et de pesée.

Nous avons déjà eu l'occasion de noter précédemment certaines différences dans les résultats fournis par les techniques de numération et de pesée. Nous n'exposerons ici que la différence fondamentale qui caractérise les résultats respectivement obtenus.

Considérons à titre d'exemple les résultats des essais n°ˢ 8 et 9 (Tableaux V et VI) où les cultures effectuées sur les deux milieux ont été suivies simultanément par les deux techniques.

Nous avons remarqué, aussi bien en milieu synthétique qu'en bouillon de viande, que l'augmentation des poids ne se poursuivait pas au même rythme que l'augmentation des nombres des germes. Si nous considérons ces rythmes à partir de la cinquième heure pour le milieu synthétique, et à partir de la deuxième heure pour le bouillon de viande, c'est-à-dire à partir des heures où les bactéries entraient dans leur phase de multiplication logarithmique, nous constatons alors que l'augmentation des nombres se poursuit à un rythme nettement plus rapide que l'augmentation des poids. Si nous supposons que le nombre de bactéries présentes à la cinquième heure dans le milieu synthétique, et à la deuxième heure dans le bouillon de viande, est égal à 1, et leur poids aux mêmes heures égal à 1, ces chiffres prendront aux heures suivantes des valeurs de l'ordre de celles qui sont données dans le Tableau VI *bis*.

Nous avons arrêté les comparaisons à la quarante-huitième heure, car à partir de cette heure, le Staphylocoque commençait à entrer dans sa phase de maximum stationnaire.

TABLEAU VI *bis*

Comparaison des augmentations des poids et des nombres du Staphylocoque doré.

A. En milieu synthétique

(d'après les résultats de l'essai 8)

Heures	Poids en mgrs par cc	Nombres de germes par cc	Augmentation des poids	Augmentation des nombres
5	0,032	600,000	1	1
8	0.075	1.800.000	2,3	3
24	0,919	120 000.000	28,7	200
48	1,100	175.000.000	34	291

B. En bouillon de viande

(d'après les résultats de l'essai 9)

Heures	Poids en mgrs par cc	Nombres de germes par cc	Augmentation des poids	Augmentation des nombres
2	0,028	1.000.000	1	1
5	0,099	63.000.000	3,5	63
8	0,177	120.000.000	6	120
24	1.023	1.180.000.000	36	1180
48	1,481	1.900.000.000	53	1900

Nous remarquons, d'après le tableau VI *bis*, que l'augmentation des nombres était, dans les deux milieux et surtout dans le bouillon de viande, nettement plus marquée que l'augmentation des poids. Ainsi, dans le milieu synthétique, entre la cinquième et la quarante-huitième heure, alors que les poids microbiens augmentaient seulement de 34 fois, le nombre des germes était multiplié par 291. En bouillon de viande, de la deuxième à la quarante-huitième heure, l'augmentation des poids étant de 53, celle des nombres passait de 1 à 1.900.

Si nous examinons de près les résultats des autres essais, nous remarquons également des différences dans la progression relative des nombres de germes et de leurs poids. Ainsi les essais n^{os} 2 et 3 (Tableau II) et les essais n^{os} 6 et 7 (Tableau IV) nous ont fourni des augmentations des poids et des nombres de l'ordre suivant :

— En milieu synthétique :

Augmentation des poids de la 5^{e} à la 48^{e} heure	De 1 à 29
Augmentation des nombres dans le même temps	De 1 à 135

— En bouillon de viande :

Augmentation des poids de la 2^{e} à la 48^{e} heure	De 1 à 33
Augmentation des nombres dans le même temps	De 1 à 554

Ces résultats concordent avec ceux antérieurement observés par D. Bach (4) qui, étudiant le développement du Staphylocoque doré par la méthode de pesée après filtration sur creusets d'Iéna et comparant ses résultats aux résultats des numérations des autres auteurs, avait trouvé également une grande différence entre les rythmes d'augmentation des nombres et des poids bactériens.

Cette constatation nous amenait donc à supposrr que chaque microbe ne présentait pas le même poids aux

différentes heures de culture, et que le poids des germes était de moins en moins grand à mesure qu'évoluait la culture.

Pour vérifier cette hypothèse, il nous a semblé intéressant de calculer le poids théorique d'un même nombre de germes considérés à différentes heures de leur multiplication, soit en bouillon de viande, soit en milieu synthétique. Il est évident que l'on ne saurait attribuer à ces nombres des valeurs absolues, étant donnée la difficulté d'obtenir une précision rigoureuse dans les premières heures de développement, et étant donnée également la nature complexe de la substance pesée dans les derniers jours de culture.

Le Tableau VI *ter* rassemble les résultats de ce calcul, indiquant les poids secs d'un million de Staphylocoques dorés. Ces résultats ont été calculés d'après ceux de l'essai n° 8 (Tableau V) effectué en milieu synthétique et d'après ceux de l'essai n° 9 (Tableau VI) effectué en bouillon de viande.

TABLEAU VI*ter*

Poids (en milligrammes) d'un million de Staphylocoques dorés, aux différentes heures de culture.

Heures de culture	Milieu synthétique	Bouillon de viande
	mgr	mgr
0	0,004	0,003
2	0,045	0,028
5	0,053	0,0015
8	0,0416	0,0014
24	0,0076	0,0008
48	0,0063	0,00078
4e Jour	0,0066	0,0008
7e J.	0,0068	0,0008
14e J.	0,015	0,0236

Nous remarquons, d'après les chiffres du tableau VI *ter*, que le Staphylocoque ne réalisait un accroissement de poids que dans la période de latence, c'est-à-dire de l'heure 0 à l'heure 2 en bouillon de viande, et de l'heure 0 à l'heure 5 en milieu synthétique. Dépassée cette phase, les bactéries subissaient une diminution de poids sensible à mesure que vieillissait la culture. Néanmoins, leur poids semblait se stabiliser à partir de la vingt-quatrième heure. En effet, entre la vingt-quatrième heure et le septième jour, les poids observés dans les deux milieux de culture peuvent être considérés, aux erreurs d'expérience près, comme constants. C'est pour cette raison d'ailleurs que nous n'avons obtenu un certain parallélisme entre les courbes des pesées et celles des numérations qu'à ces périodes de culture.

Nous n'avons pas pris en considération les chiffres correspondant au quatorzième jour de culture, car, comme nous l'avons déjà signalé, à ce moment le Staphylocoque entrait déjà dans sa phase de destruction, et l'accumulation des produits du métabolisme et autres substances ne nous permettait pas d'interpréter avec certitude les résultats des pesées.

Si nous laissons de côté les valeurs pondérales calculées à l'heure 0, et qui, théoriquement, devraient être égales, aux erreurs d'expérience près, nous remarquons que les chiffres obtenus en milieu synthétique sont, dans l'ensemble, beaucoup plus grands que ceux obtenus aux mêmes heures de culture en bouillon de viande. Et à partir de la vingt-quatrième heure jusqu'au septième jour (où les poids microbiens étaient devenus à peu près constants dans les deux milieux), le Staphylocoque présentait, en milieu synthétique, un poids environ dix fois supérieur à celui calculé en bouillon de viande.

Est-ce à dire par là que le milieu de culture influe sur le poids des bactéries ? Une reproduction microbienne intense ne joue-t-elle pas également ici un cer-

tain rôle ? D'autre part, les modifications de structure et les variations morphologiques des bactéries au cours de leur développement contribuent-elles aussi à leur diminution progressive de poids dans les premières heures de culture ?

Il nous a semblé intéressant d'essayer de résoudre ces questions en suivant la morphologie des bactéries aux diverses heures de leur culture. Mais étant donnée l'impossibilité où nous étions d'effectuer ces recherches sur le Staphylocoque, nous nous sommes adressé alors à un bacille : le Colibacille, dont la forme en bâtonnet se prêtait mieux à ce genre d'études.

Dans le chapitre suivant, nous exposerons les résultats obtenus dans l'étude simultanée de la multiplication du B. Coli et de ses variations morphologiques au cours de la culture.

Conclusions de l'étude du Staphylocoque.

Le dénombrement des bactéries nous a montré que le Staphylocoque doré se développait normalement dans notre milieu synthétique, en passant par les phases habituelles de la multiplication microbienne. Nous avons cependant remarqué qu'en milieu synthétique, le temps de latence était plus long qu'en bouillon de viande, et que, pendant la phase logarithmique, le rythme de multiplication des germes était moins accéléré dans le premier milieu que dans le second; le maximum atteint était aussi moins grand dans le milieu synthétique. Par contre, le rythme de destruction des bactéries était plus accentué dans le bouillon de viande que dans le milieu synthétique, ce qui semble montrer que le Staphylocoque, s'il se développait moins bien dans ce dernier milieu, y conservait néanmoins une vitalité plus longue.

La pesée des masses microbiennes nous a permis d'observer, dans les deux milieux utilisés, l'absence des phases de latence et de déclin. Au cours de nos expériences, les poids microbiens observés dans le milieu synthétique étaient toujours restés inférieurs à ceux observés en bouillon de viande, les poids initiaux étant égaux dans les deux milieux. Mais si la masse bactérienne développée était plus importante dans le milieu naturel, chaque germe considéré isolément, présenterait un poids moyen plus fort en milieu synthétique.

Les résultats obtenus au cours des numérations et des pesées nous ont permis de noter que l'augmentation des nombres des microbes se poursuivait à un rythme beaucoup plus rapide que l'augmentation de leurs poids. Il se pourrait que cette divergence soit due au fait que les cocci, après une augmentation pondérale pendant la phase de latence, diminuent ensuite progressivement leur poids individuel, jusqu'à la vingt-quatrième heure de culture.

CHAPITRE III

Études de la multiplication et des variations morphologiques du colibacille cultivé en milieu synthétique.

Nous avons remarqué, lors de l'étude du Staphylocoque, que l'augmentation des poids et l'augmentation des nombres des microbes ne se réalisaient pas suivant le même rythme, et que cette divergence semblait être en rapport avec la diminution progressive du poids de chaque microbe à partir de la phase de multiplication logarithmique. Nous nous sommes demandé si cette diminution de poids n'était pas due à la variabilité de la taille des microbes au cours de leur développement. Le Staphylocoque se prêtant difficilement aux examens morphologiques, nous avons choisi pour étudier ce point, un bacille : le Colibacille.

Nous avons donc étudié systématiquement les variations morphologiques du Colibacille au cours de son développement, lequel était suivi à la fois par une technique de pesée et par deux techniques de numération des germes.

Les essais ont été effectués dans un milieu synthétique, dans le but de confirmer certaines de nos conclusions formulées précédemment au sujet du Staphylocoque.

Nous avons néanmoins effectué une étude des variations morphologiques en bouillon de viande en vue de rechercher s'il y avait parallélisme entre les modifications existant dans ce milieu et dans notre milieu synthétique.

Nous avons donc étudié successivement les points suivants :

I. — La *multiplication* du Colibacille en milieu synthétique. Nous avons suivi cette multiplication à la fois par les méthodes de *numération* sur plaques de gélose et de « Wright-Fries », et par la méthode de *pesée* après filtration sur creusets d'Iéna.

II. — La *morphologie* du Colibacille cultivé en milieu synthétique et en bouillon de viande. Nous avons suivi les variations morphologiques d'une part au microscope en dessinant les germes à l'aide d'une « chambre claire », et d'autre part par microphotographie.

I

Étude de la multiplication du B. Coli dans un milieu synthétique.

Essais personnels.

Souche Employée.

Nous avons utilisé une souche de B. Coli provenant du Laboratoire des Travaux pratiques de Bactériologie de la Faculté de Pharmacie de Paris, conservée au frais en gélatine nutritive, et réensemencée périodiquement sur gélose inclinée.

Milieu Synthétique Employé.

Nous avons utilisé le milieu synthétique de Péré (64), dont la composition est la suivante :

— Succinate d'ammoniaque	20 gr.
— Phosphate bi-acide de potassium .	2,50
— Phosphate de soude.	2,50
— Sulfate de magnésie.	1,50
— Chlorure de sodium.	1,25
— Eau distillée	1000 cc

Ce milieu était ajusté à pH. 7,4; filtré et stérilisé à l'autoclave à 110° pendant vingt minutes.

Remarquons que ce milieu ne contient pas de facteurs de croissance, le B. Coli n'en nécessitant pas pour son développement.

Essais Réalisés.

Nous avons effectué les essais suivants :

— Trois séries d'essais dans lesquelles nous avons dénombré les germes en utilisant la méthode des plaques de gélose et la méthode microscopique de Wright-Fries.

— Trois séries d'essais dans lesquelles nous avons suivi la multiplication des germes par la méthode de pesée après filtration sur creusets d'Iéna. Ces derniers essais ont été effectués parallèlement aux essais de numération.

Nous ne revenons pas ici sur les techniques employées qui ont été décrites en détail au Chapitre I (v. page 20).

Résultats Obtenus.

Nous avons résumé les résultats obtenus sous forme de tableaux. Dans ces tableaux, nous avons indiqué les résultats des numérations (nombre de microbes rapportés à 1 cc. de milieu de culture) et les résultats des pesées (poids microbiens, en milligrammes, rapportés à 1 cc. de milieu de culture) aux diverses heures de culture à 37°.

Nous avons pris, pour construire des courbes, les logarithmes de ces valeurs. Sur ces courbes sont portés en ordonnées les logarithmes des nombres ou des poids des microbes, et en abscisses les heures ou jours de culture.

Dans le tableau VII nous avons reporté les résultats des essais n°s 1 et 2, fournis respectivement par la méthode de pesée après filtration sur creuset d'Iéna et par la méthode de numération sur plaques de gélose. Les courbes correspondantes sont représentées dans la figure 7.

Dans le tableau VIII, nous avons reporté les résultats des essais n°s 3 et 4, fournis respectivement par les mêmes méthodes que précédemment. Les courbes correspondantes sont représentées dans la figure 8.

Dans le tableau IX, nous avons reporté les résultats des essais n°s 5 et 6, fournis respectivement par la même méthode de pesée et par la méthode de numération indirecte « Wright-Fries ». Les courbes correspondantes sont représentées dans la figure 9.

TABLEAU VII

Multiplication du B. Coli en milieu synthétique de Péré.

Pesée après filtration sur creusets d'Iéna. Et numération par la méthode des plaques de gélose.

Heures de culture à 37°	PESÉE (Essai 1)		NUMÉRATION (Essai 2)	
	Poids en mgrs rapportés à 1cc de culture	Logarithmes des 1/1000e de mgr	Nombres de germes par cc	Logarithmes
0	0,005	0,70	243.000	5,38
2	0,030	1,48	420.000	5,62
5	0,051	1,70	1.170.000	6,07
8	0,078	1,89	6.900.000	6,84
24	0,198	2,30	433.000.000	8,64
48	0,363	2,56	1.700.000.000	9,23
1e Jour	0,405	2,61	200.000.000	8,30
7e J.	0,427	2,63	115.000.000	8,06

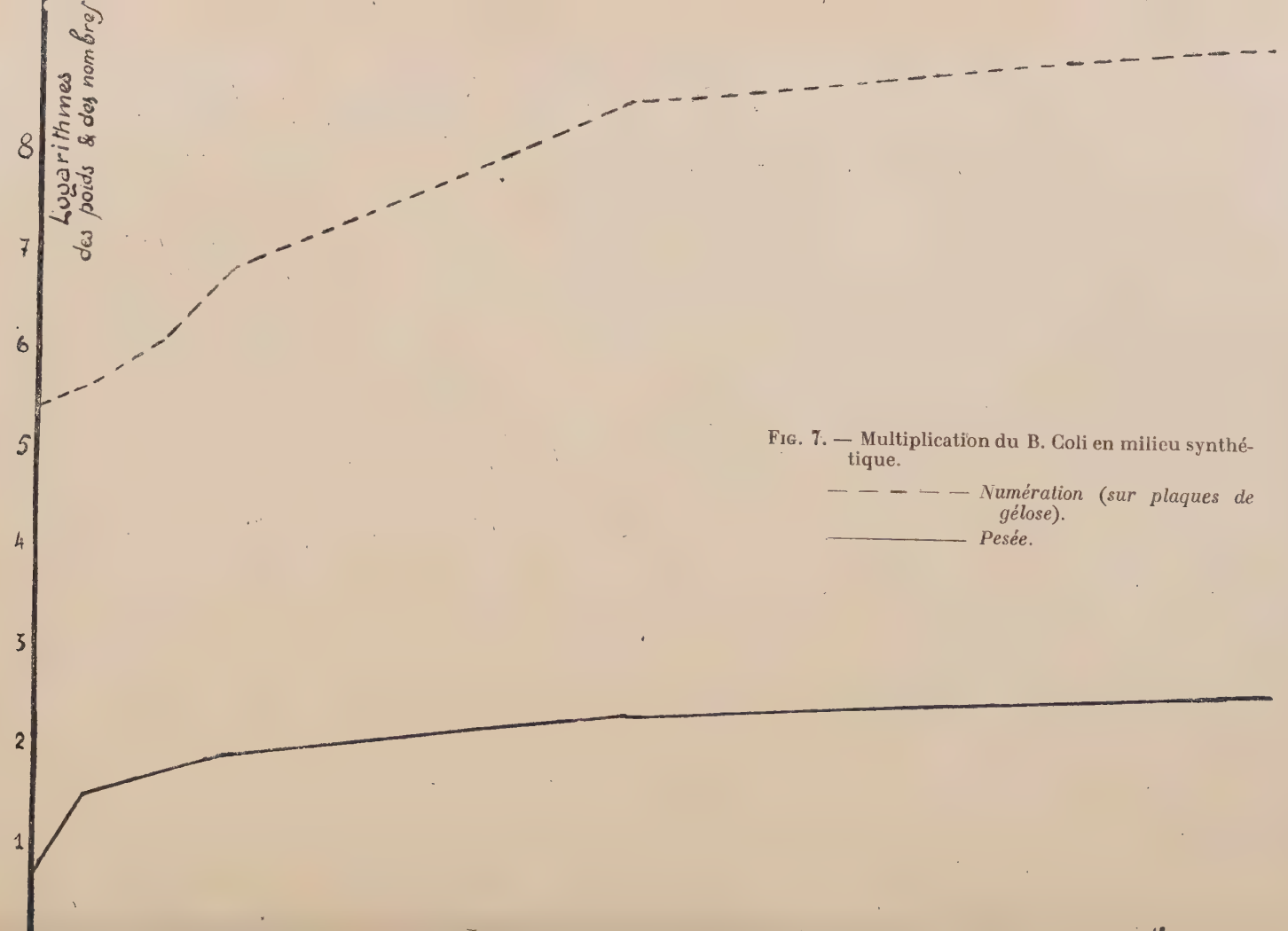


FIG. 7. — Multiplication du B. Coli en milieu synthétique.

— — — — — *Numération (sur plaques de gélose).*

———— *Pesée.*

TABLEAU VIII

Multiplication du B. Coli en milieu synthétique de Péré.

Pesée après filtration sur creusets d'Iéna. Et numération par la méthode des plaques de gélose.

Heures de culture à 37°	PESÉE (Essai 3)		NUMÉRATION (Essai 4)	
	Poids en mgrs rapportés à 1cc de culture	Logarithmes des 1/1000e de mgr	Nombres de germes par cc	Logarithmes
0	0,005	0,70	200.000	5,30
2	0,0265	1,42	400.000	5,60
5	0,035	1,54	740.000	5,87
8	0,070	1,84	5.500.000	6,74
24	0,279	2,44	835.000 000	8 92
48	0,431	2,63	1.500.000.000	9,18
4e Jour	0,652	2,81	700.000.000	8,84
7e J.	0,683	2,83	70.000.000	7,84

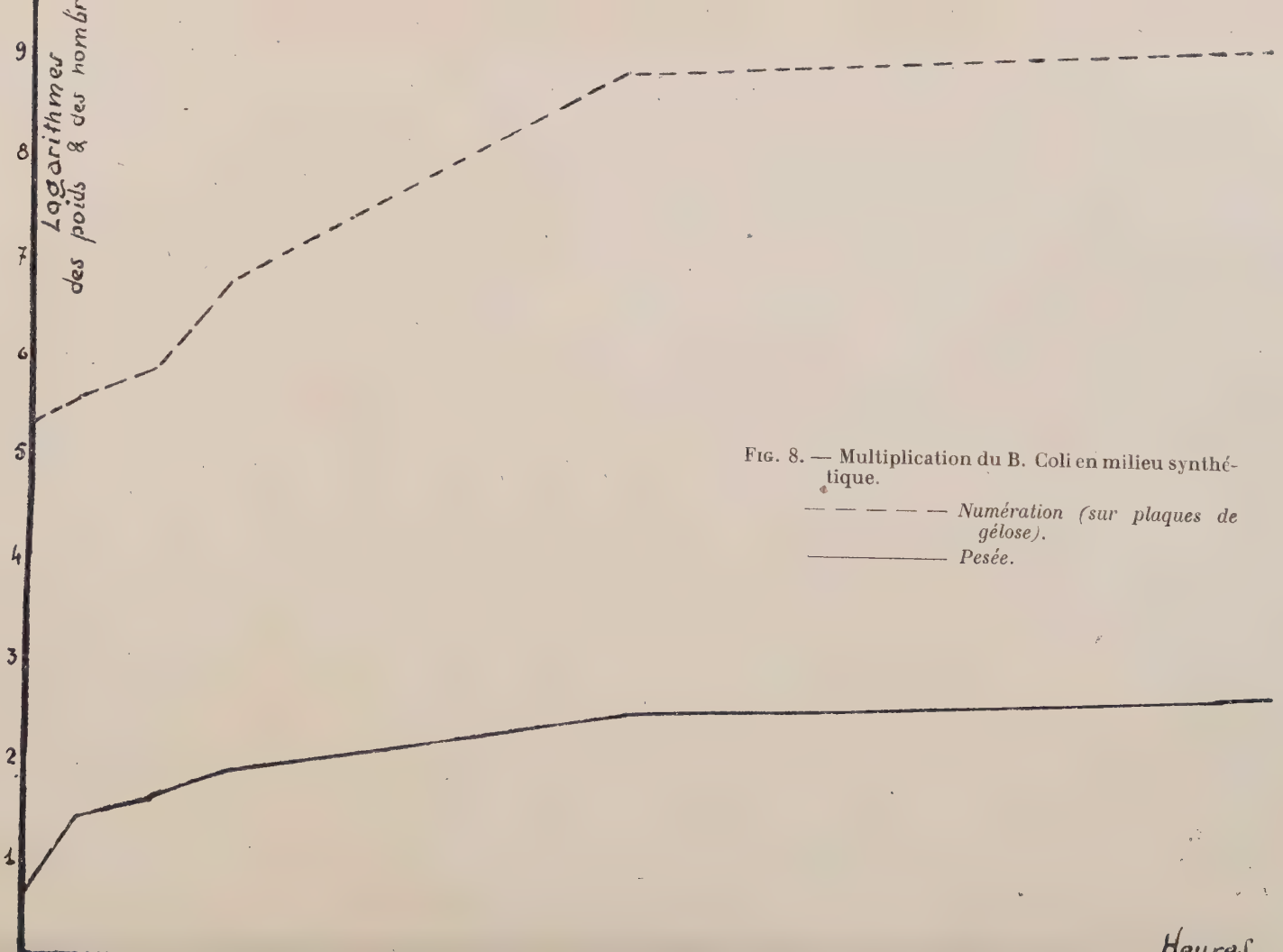


FIG. 8. — Multiplication du B. Coli en milieu synthétique.

— — — — — *Numération (sur plaques de gélose).*

———— *Pesée.*

TABLEAU IX

Multiplication du B. Coli en milieu synthétique de Péré.

Pesée après filtration sur creusets d'Iéna. Et numération par la méthode de « Wright-Fries ».

Heures de culture à 37°	PESÉE (Essai 5)		NUMÉRATION (Essai 6)	
	Poids en mgrs rapportés à 1cc de culture	Logarithmes des 1/1000e de mgr	Nombres de germes par cc	Logarithmes
0	0,009	0,95	1.000.000	6,00
2	0,037	1,57	3.000.000	6,48
5	0,056	1,75	8.700.000	6,94
8	0,120	2,08	38.540.000	7,59
24	0,450	2,65	1.560.000.000	9,19
48	0,638	2,80	3.196.000.000	9,50
4e Jour	0,768	2,88	2.950.000.000	9,47
7e J.	0,810	2,91	1.870.000.000	9,27

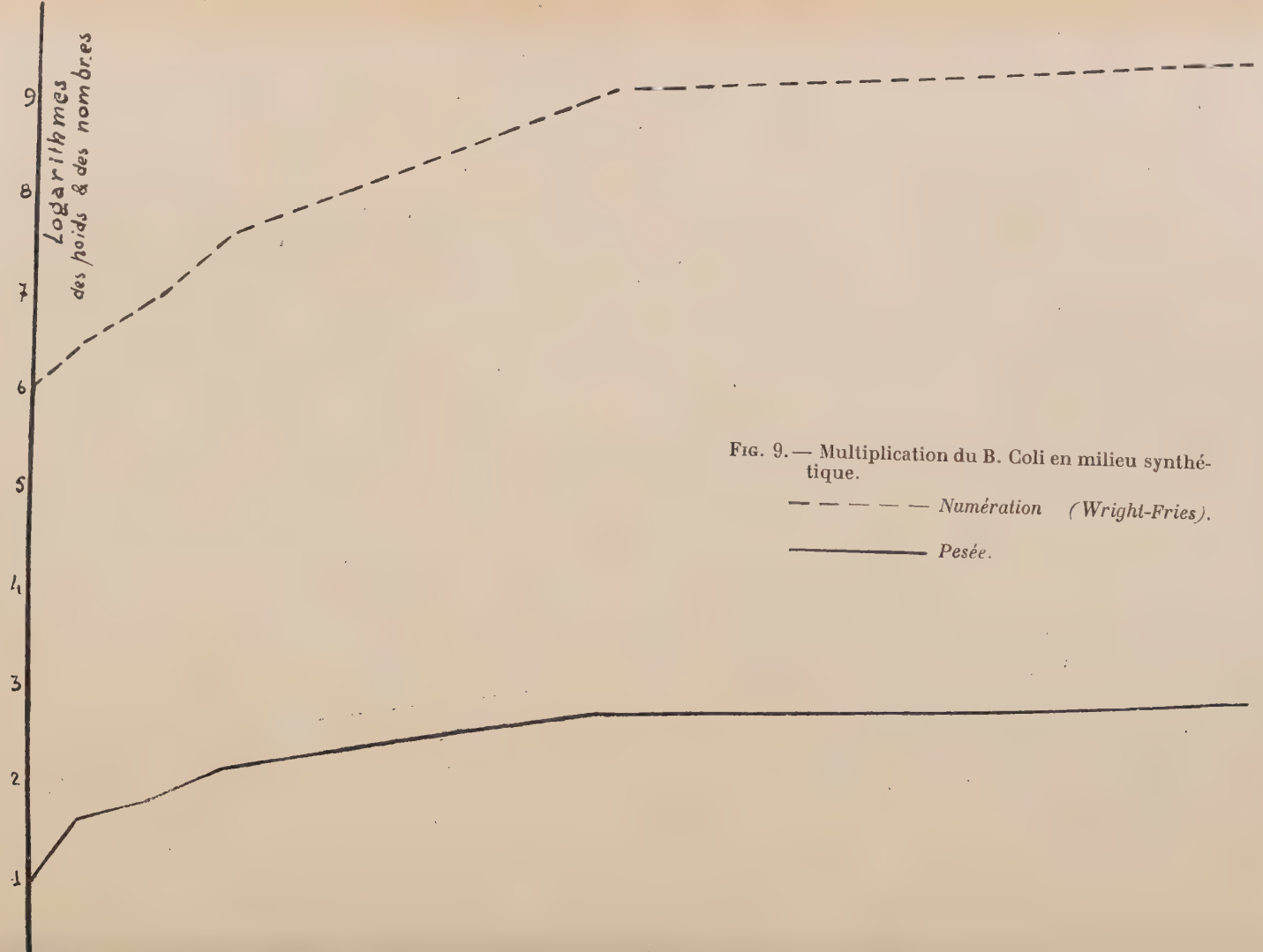


FIG. 9. — Multiplication du B. Coli en milieu synthétique.

— — — — — *Numération (Wright-Fries).*

——————— *Pesée.*

Discussion des résultats obtenus.

1° Résultats obtenus dans l'étude de la multiplication du B. Coli en milieu synthétique, par dénombrement des bactéries.

L'utilisation des méthodes de numération nous a permis de retrouver à peu près les mêmes phases que dans l'étude du Staphylocoque. Nous avons pu cependant noter quelques petites différences selon la méthode de numération employée (numération sur plaques de gélose, ou par la technique de Wright-Fries) :

En dénombrant les germes par la méthode des plaques de gélose, nous avons retrouvé la *phase de latence*. Mais cette phase ne paraissait pas exister lorsque les numérations étaient effectuées par la méthode de Wright-Fries, ce qui confirme les résultats antérieurement obtenus au Laboratoire de J. Régnier.

Cette phase de latence était relativement longue, elle durait jusqu'à la cinquième heure, comme dans les essais effectués avec Staphylocoque. Nous verrons dans un instant, qu'en bouillon de viande, elle durait seulement jusqu'à la deuxième heure. Nous avons dit que R. David (21) et J. Monod (59) avaient constaté également la longueur de cette phase quand ils cultivaient, le premier, le bacille Pyocyanique, et le second, le B. Subtilis, dans des milieux synthétiques.

La *phase logarithmique* était — pour les deux méthodes de numération — moins accentuée que celle que l'on observait quand on cultivait le B. Coli en bouillon de viande. Par la méthode des plaques de gélose, elle ne commençait guère qu'à la cinquième heure dans notre milieu synthétique, et se poursuivait jusqu'à la quarante-huitième heure, alors qu'en bouillon de viande cette phase débutait dès la deuxième heure et durait aussi jusqu'à la quarante-huitième heure de culture, (d'après les résultats établis antérieurement par divers

auteurs, et par Y. Jund (41). Par la technique indirecte de Wright-Fries, nous avons trouvé, comme les auteurs qui nous ont précédé, que la phase logarithmique commençait dès l'ensemencement, et durait jusqu'à la huitième heure. Mais alors qu'entre l'heure 0 et la huitième heure, nos chiffres logarithmiques variaient, en milieu synthétique, entre 6 et 7,59, les valeurs obtenues en bouillon de viande par Y. Jund (41) variaient entre 5,69 et 9. Ceci revient à dire que la multiplication du B. Coli dans le milieu synthétique utilisé était moins précoce et moins rapide qu'en bouillon de viande. Nous étions arrivé à cette même conclusion lors de l'étude du Staphylocoque.

Le *maximum* atteint se montrait plus élevé par la méthode indirecte de Wright-Fries que par la méthode des plaques de gélose, ce qui ne saurait nous étonner, puisque la première méthode nous permettait de dénombrer tous les microbes, morts ou vivants, capables ou non de survivre à un changement de milieu, tandis que, par la seconde, nous ne comptions que les microbes capables de résister au transport dans un milieu neuf. Ces résultats concordent avec ceux des auteurs qui ont employé simultanément ces deux méthodes de numération, et que nous avons déjà eu l'occasion de citer.

Pour les mêmes raisons, nous observions, dans la *phase de déclin*, que le nombre de microbes décroissait plus vite par la méthode de numération sur plaques de gélose que par la méthode indirecte de « Wright-Fries ».

2° Résultats obtenus dans l'étude de la multiplication du B. Coli en milieu synthétique, par la méthode de pesée.

Les essais effectués avec la méthode de pesée nous ont donné des résultats identiques à ceux obtenus dans l'étude pondérale du développement du Staphylocoque.

Nous n'avons pas observé de phase de latence.

La *phase d'augmentation pondérale marquée* commençait aussitôt après l'ensemencement et durait jusqu'à la deuxième heure de culture.

L'augmentation pondérale pendant cette phase était de moitié plus faible que dans le cas du Staphylocoque. Avec ce dernier germe, cette augmentation avait été de : 1 × 10 (V. page 65) ; elle n'était plus ici que de 1 × 5 environ. En effet, les poids microbiens observés à l'heure initiale et à la deuxième heure étaient respectivement dans les trois essais différents de :

0 mgr 005 et 0 mgr 030 (Tableau VII)
0 mgr 005 et 0 mgr 0265 (Tableau VIII)
0 mgr 009 et 0 mgr 037 (Tableau IX)

La *phase d'augmentation pondérale faible* débutait à la deuxième heure et durait jusqu'à la quarant-huitième heure. Mais, comme dans l'étude du Staphylocoque, si cette augmentation était assez appréciable entre les deuxième et vingt-quatrième heure, elle devenait faible entre les vingt-quatrième et quarante-huitième heure.

Nous avions en effet respectivement les poids suivants aux heures 2, 24 et 48 :

2e H.	24e H.	48e H.
0 mgr 030	0 mgr 198	0 mgr 363 (Tableau VII)
0 mgr 0265	0 mgr 279	0 mgr 431 (Tableau VIII)
0 mgr 037	0 mgr 450	0 mgr 638 (Tableau IX)

Nous voyons que l'augmentation était de 1 × 6 à 1 × 12 entre la deuxième et la vingt-quatrième heure, et seulement de 1 × 1,5 environ entre la vingt-quatrième et la quarante-huitième heure.

A partir de la quarante-huitième heure, l'augmentation pondérale était devenue extrêmement faible. C'est la *phase de maximum stationnaire* qui ne présentait d'intérêt qu'à ses débuts, pour des raisons que nous avons exposées lors de l'étude pondérale du Staphylocoque.

— Nous avons remarqué dans l'étude pondérale du B. Coli, qu'à partir de la vingt-quatrième heure, les poids microbiens restaient toujours inférieurs à ceux observés dans l'étude du Staphylocoque. Ainsi, dans l'étude du B. Coli nous notons les poids suivants, respectivement à la vingt-quatrième heure, à la quarante-huitième heure et au quatrième jour :

24e H.	48e H.	4e J.
0 mgr 198	0 mgr 363	0 mgr 405 (Tableau VII)
0 mgr 279	0 mgr 431	0 mgr 652 (Tableau VIII)
0 mgr 450	0 mgr 638	0 mgr 768 (Tableau IX)

Dans l'étude du Staphylocoque, nous notions aux mêmes heures, les poids respectifs suivants :

24e H.	48e H.	4e J.
0 mgr 804	0 mgr 869	1 mgr 050 (Tableau IV)
0 mgr 919	1 mgr 10	1 mgr 317 (Tableau V)
0 mgr 023	1 mgr 481	1 mgr 658 (Tableau VI)

Et cependant, à l'heure 0, les poids initiaux des B. Coli étaient dans tous les essais, plus grands que les poids initiaux des Staphylocoques.

Si nous comparons maintenant, non plus les poids, mais les nombres des B. Coli à ceux des Staphylocoques aux mêmes temps de culture, nous remarquons que les premiers étaient tantôt plus grands et tantôt plus petits que les seconds. Nous avions, par exemple, dans les essais nos 7 et 8, respectivement aux vingt-quatrième, quarante-huitième heure, et quatrième jour, les nombres de B. Coli suivants :

24e H.	48e H.	4e J.
433.000.000	1.700.000.000	200.000 000 (Tableau VII)
835.000.000	1.500.000.000	700.000.000 (Tableau VIII)

et respectivement aux mêmes heures les nombres de Staphylocoques suivants (d'après les essais nos 5 et 6) :

120.000.000	175.000.000	200.000.000 (Tabl. V)
1.180.000.000	1.900.000.000	2.000.000.000 (Tab. VI)

Ce qui précède nous montre que les poids microbiens ne varient pas proportionnellement aux nombres des germes. Nous avons vu qu'il en était ainsi dans l'étude du Staphylocoque. Nous allons avoir une confirmation supplémentaire dans le paragraphe suivant.

3° Comparaison des résultats fournis par les méthodes de numération et de pesée.

D'après les résultats des numérations et des pesées, nous remarquons, comme précédemment dans l'étude du Staphylocoque, que l'augmentation des poids des microbes ne se poursuit pas au même rythme que l'augmentation de leurs nombres.

Si nous supposons, ici encore, que le nombre de bactéries présentes à la cinquième heure (heure où les bactéries, dans le milieu synthétique utilisé, entraient dans la phase logarithmique) est égal à 1, et leur poids égal à 1, ces chiffres prendront aux heures suivantes des valeurs de l'ordre de celles qui sont données dans le Tableau X.

Nous avons arrêté notre examen à la quarante-huitième heure, heure à laquelle le Colibacille a atteint son maximum de multiplication.

TABLEAU X

Tableau comparatif des augmentations des poids et des nombres du B. Coli (cultivé en milieu synthétique de Péré) aux 8e, 24e, 48e heures par rapport à la 5e heure.

Essais	Heures	Poids en mgrs par cc	Nombres de germes par cc	Augmentation des poids	Augmentation des nombres
	5	0,051	1.170.000	1	1
Essais	8	0,078	6.900.000	1,50	6
1 et 2	24	0,198	433.000 000	4	370
	48	0,363	1.700.000.000	7	1453
	5	0,035	740.000	1	1
Essais	8	0,070	5.500.000	2	70
3 et 4	24	0,279	835.000.000	7,7	1128
	48	0,431	1.500.000.000	12	2027
	5	0,056	8.700.000	1	1
Essais	8	0,120	18.540.000	2	5
4 et 5	24	0,450	1.560.000.000	8	179
	48	0,638	3.196.000.000	11	367

Nous remarquons (tableau X) que les augmentations des nombres des microbes étaient, dans les trois essais, nettement plus marquées que celles des poids microbiens.

Ainsi, dans les essais n^{os} 1 et 2 par exemple, pendant que les augmentations des poids aux huitième, vingt-quatrième et quarante-huitième heures par rapport à la cinquième heure étaient multipliées respectivement par :

1,5 — 4 — 7

les augmentations des nombres aux mêmes heures étaient multipliées respectivement par :

6 — 370 — 1453

Dans les essais n^{os} 3 et 4, n^{os} 5 et 6, les deux sortes d'augmentations aux mêmes heures étaient de :

Essais 3 et 4.

Augmentations des poids	2	7,7	12
Augmentations des nombres .	70	1128	2027

Essais 5 et 6.

Augmentations des poids....	2	8	11
Augmentations des nombres.	5	179	367

Nous avons déjà constaté cette disproportionalité entre les augmentations des poids et celles des nombres des microbes lors de l'étude du Staphylocoque, constatation qui nous a amené à supposer que chaque microbe ne conserve pas le même poids au cours de son développement. Cette hypothèse se trouvait vérifiée en calculant le poids théorique d'un même nombre de germes considérés aux différentes heures de leur développement. Il en est de même si nous établissons le poids théorique d'un même nombre de Colibacilles (un million) aux différentes heures de culture.

Ces résultats, rassemblés dans le Tableau XI, ont été calculés d'après ceux des essais n^{os} 1 et 2 (Tableau VII), n^{os} 3 et 4 (Tableau VIII), n^{os} 5 et 6 (Tableau IX), effec-

tués en milieu synthétique. Les chiffres de la deuxième et de la troisième colonnes ont été calculés d'après les résultats des numérations sur plaques de gélose. Ceux de la quatrième colonne ont été calculés d'après les résultats des numérations par la méthode de Wright-Fries.

TABLEAU XI

Poids (en milligrammes) d'un million de Colibacilles aux différentes heures de culture.

Heures de culture	Résultats calculés d'après ceux des numérations sur plaques de gélose		Résultats calculés d'après ceux des numérations par Wright-Fries
	(Essais 1 et 2)	(Essais 3 et 4)	(Essais 5 et 6)
	mgr	mgr	mgr
0	0,02	0,025	0,009
2	0,07	0,066	0,012
5	0,043	0,047	0,0064
8	0,011	0,013	0,0031
24	0,00046	0,00033	0,0003
48	0,0002	0,0003	0,0002
4e Jour	0,002	0,001	0,00026
7e J.	0,003	0,01	0,00043

Si nous examinons les résultats rassemblés dans le tableau XI, nous remarquons que le Colibacille, comme le Staphylocoque, ne réalisait une augmentation de poids que dans la période de latence, et que, après cette phase, son poids diminuait sensiblement jusqu'à la vingt-quatrième heure où il tendait à devenir constant jusqu'à la quarante-huitième heure.

Nous n'avons pas pris en considération les chiffres

correspondant aux quatrième et septième jours, car à ces moments, le Colibacille entrait déjà dans sa phase de déclin, et l'accumulation dans le milieu des produits du métabolisme et autres substances de déchet ne nous donnait plus une idée exacte des poids de bactéries.

Nous remarquons en outre que les chiffres de la quatrième colonne sont nettement plus faibles que ceux des deuxième et troisième colonnes, qui sont d'ailleurs sensiblement voisins. Ceci n'a rien d'étonnant si nous nous rappelons que ces derniers chiffres ont été calculés d'après les résultats des numérations par la technique de Wright-Fries qui fournissait toujours des nombres de bactéries plus grands que la méthode des plaques. Il est évidemment plus plausible de considérer les résultats des pesées par rapport à ceux des numérations effectuées par la technique de Wright-Fries qui permettait de dénombrer toutes les bactéries, alors que la méthode des plaques laissait échapper un certain nombre d'entre elles, les moins « résistantes » qui intervenaient cependant dans les pesées. Mais ce que nous cherchions à connaître, ce n'était pas la valeur absolue des poids des bactéries, mais plutôt leurs variations au cours d'une culture. Et ces variations, comme le montrent les chiffres du Tableau XI, étaient identiques lorsqu'on les calculait d'après les résultats fournis par les deux techniques de numération, à savoir que les poids microbiens, après un accroissement dans la phase de latence, diminuaient progressivement jusqu'à la vingt-quatrième heure de culture où ils tendaient à devenir constants jusqu'à la quarante-huitième heure.

C'est ce que nous avons déjà observé dans l'étude du Staphylocoque. Nous allons rapporter ci-dessous, les essais réalisés en vue de rechercher si ces variations pondérales avaient quelque rapport avec les modifications morphologiques des bactéries au cours de leur développement.

Conclusions de l'étude de la multiplication du B. Coli.

Le Colibacille se développait normalement dans notre milieu synthétique, en passant par les phases habituelles de la multiplication microbienne. Toutefois, en le dénombrant par la technique microscopique indirecte de Wright-Fries, nous n'avons pas observé de phase de latence; le maximum atteint était plus élevé que celui obtenu par la méthode des plaques de gélose, et la phase de déclin était aussi plus longue que celle fournie par cette dernière méthode.

La pesée des masses microbiennes ne nous a permis d'observer ni phase de latence, ni phase de déclin, comme dans l'étude du Staphylocoque. Mais elle nous a permis de constater que les *poids* des Colibacilles, qui étaient dans les premières heures de culture parfois supérieurs à ceux des Staphylocoques, étaient toujours inférieurs aux poids de ces derniers germes à partir de la vingt-quatrième heure; alors que les *nombres* des bacilles étaient, du début jusqu'à la fin des cultures, tantôt plus grands et tantôt plus petits que ceux des cocci. Les poids des germes n'ont pas donc varié proportionnellement à leurs nombres.

Les techniques de numération et de pesée nous ont montré, comme dans l'étude du Staphylocoque, que l'augmentation des nombres des microbes se poursuivait à un rythme beaucoup plus rapide que celle de leurs poids, et que cette divergence pourrait provenir du fait que le Colibacille, après une augmentation pondéral pendant la phase de latence, diminuait ensuite progressivement de poids.

II

Étude morphologique du B. Coli en fonction de l'âge de la culture.

Nous avons entrepris cette étude dans le but :

1) De savoir si la diminution du poids moyen des microbes au cours de la culture avait quelque relation avec leurs modifications morphologiques.

2) D'établir le rapport qui pourrait exister entre les variations morphologiques des bactéries d'une part, et les diverses phases de la multiplication microbienne d'autre part.

Avant de donner les résultats de nos essais, nous rappellerons d'abord brièvement les principaux travaux concernant les variations morphologiques des bactéries au cours du développement d'une culture.

A. — *Rappel des principaux travaux concernant les variations morphologiques des bactéries.*

Il est de notion classique que l'âge et la nature du milieu de culture exercent une influence certaine sur les variations morphologiques des bactéries. Il en est ainsi de même des agents externes physiques ou chimiques.

Ces variations sont considérées comme temporaires, c'est-à-dire que le type primitif tend toujours à reparaître lorsque les conditions de culture redeviennent normales.

C'est ainsi que Guignard et Charrin (32) en 1889 montrèrent que dans les cultures de B. Pyocyanique maintenues à la température de 35° c. on pouvait observer la formation de cellules enkystées, d'arthrospores, toutes formes susceptibles de redonner des bacilles lorsqu'elles

étaient remises dans des conditions normales de végétation.

Les mêmes auteurs étudièrent aussi les changements morphologiques du même Bacille Pyocyanique sous l'action de divers antiseptiques et obtinrent : des bacilles de toutes longueurs, isolées ou associées, en pseudo-filament ou en filament, sous l'action du naphtol B (0 gr. 20 à 0 gr. 25 0/00), du thymol (0 gr. 50 à 0 gr. 60 p. 1000), de l'alcool (40 cc. 0/00), des filaments sous l'action du chromate de potassium (0 gr. 10 à 0 gr. 15 p. 1000), des bacilles incurvés en boucles ou en sprilles sous l'action de l'acide borique (6 à 7 gr. 0/00). La créosote (0 gr. 75 à 1 gr. 0/00), l'acide salycilique (1 gr. 50 à 2 gr. 0/00), le naphtol (0 gr. 20 à 0 gr. 30 0/00) donnèrent des cellules sphériques considérées comme des formes de conservation; réensemencées en bouillon, elles redonnèrent des bacilles normaux.

Guignard et Charrin estimèrent que ces résultats pouvaient être plus ou moins influencés par des différences, mêmes faibles, dans la nature du milieu, l'âge, la vitalité de la culture et la quantité de semence.

D'après eux, ces modifications morphologiques n'ébranlèrent en rien la notion généralement admise de l'espèce, elles devaient plutôt attirer l'attention sur l'influence du milieu et des antiseptiques, et mettre en garde contre la tendance à multiplier les espèces en se fondant sur des données morphologiques insuffisantes.

Gaston Bonnier (11) en 1915 montra que les bactéries marines subissaient des modifications morphologiques sous l'influence de la sursalure. Il observa des éléments déformés et une grande quantité d'éléments anormaux. Il obtint par exemple des bacilles associés en longues chaînes, des bâtonnets allongés de quatre à dix fois leur longueur habituelle, des formes filamenteuses spirillées ou immobiles, des formes droites ou incurvées mobiles rappelant de vraies spirilles. Dans tous les cas, il y avait un retard marqué dans le développement.

De nombreux auteurs, entre autres Almquist (1) (1908) en étudiant divers groupes de bacilles Coli, Typhique et Dysentérique, Fuhrmann (29) (1908) à la suite d'observations effectuées sur un organisme isolé de la bière *Pseudomonas Cerevisæe,* Hort (39) (1917) d'après des travaux portant sur le Meningocoque, Löhnis (52) dans une série de publications parues entre 1916 et 1923 sur le pléomorphisme du *Bacillus Azobacter,* conclurent à l'existence d'un cycle vital chez les micro-organismes.

D'après Fuhrman, par exemple, ce cycle comportait deux phases distinctes : un cycle mineur, ne comprenant que les changements produits dans le développement d'une cellule, d'une division à l'autre, et un cycle majeur, consistant en changements réguliers qui se produisaient au cours de l'évolution et du vieillissement de la culture.

Enderlein (23) en 1925 développa une théorie très cohérente décrivant le cycle de vie d'une bactérie. Ce cycle comporterait deux processus simultanés, « un processus de multiplication », par simple division, et un « processus de développement progressif », beaucoup plus lent, et caractérisé par une série de variations morphologiques.

Mellon (57) (1916-1926) admit l'hypothèse d'un cycle vital plus ou moins complexe et ajouta que la possibilité de reproduction directe d'un type donné « devrait comporter la mise en œuvre d'un mécanisme sexuel ».

Mais certains auteurs se montrèrent plutôt réservés devant ces hypothèses. C'est ainsi que Bergstrand (8) (1919-1923), en étudiant les variations morphologiques d'un organisme diphtéroïde, et C. Stapp et H. Zycha (81) (1931) en étudiant les variations morphologiques du B. Mycoïdès Flügge, reconnurent l'existence d'un certain pléomorphisme bactérien, mais n'avancèrent pas d'affirmations trop absolues au sujet du processus de ces variations de formes.

En réalité, la question de la variabilité morphologique microbienne est loin d'être résolue à l'heure actuelle. Nous ne nous attardons donc pas davantage sur les nombreux travaux consacrés à ces problèms de variations morphologiques. Nous allons rappeler seulement les travaux concernant plus particulièrement nos propres recherches.

En 1916, Baruch (6) en étudiant les longueurs du B. Typhique et du B. du Charbon sporulé, remarqua, le premier, les variations intéressantes de la longueur des microbes au cours de leur développement. Il trouva que les formes les plus courtes correspondaient aux périodes de poussées les plus actives.

En 1919, Clark et Ruehl (18) étudièrent les variations morphologiques d'une série de 37 espèces microbiennes en fonction de l'âge de la culture. Ils faisaient des prélèvements aux heures 1, 2, 4, 6, 9, 12, 18, 21, 24, 48, septième jour. Les préparations étaient colorées au bleu de méthylène et les mesures de grandeur déterminées par la méthode de micromètre oculaire. Leurs observations portèrent sur les variations de taille, de forme, ainsi que sur les changements observés dans la coloration des bactéries, au cours du développement de la culture.

Ils constatèrent que la taille des bactéries dans les cultures jeunes était nettement différente de la taille des bactéries dans les cultures de 24 heures, et conclurent que les variations morphologiques étaient en relation avec les différentes phases de multiplication. Pendant la phase de latence, les changements morphologiques étaient insignifiants, mais au bout de deux heures, les bactéries se coloraient mieux et leurs contours étaient plus nets. Pendant la phase logarithmique, les changements morphologiques devenaient très importants, la taille des microbes pouvait devenir deux à six fois plus grande que celle observée dans une souche de 24 heures. Pendant la phase de multiplication ralentie, jusqu'au début de la phase stationnaire, la

taille des bactéries diminuait graduellement jusqu'à atteindre la longueur des cellules des 24 heures. Dans ces dernières cultures ou dans des souches plus âgées, les auteurs observèrent des formes d' « involution », se colorant mal et ayant des formes bizarres, irrégulières.

Jensen (40), dans une série d'essais portant sur les variations morphologiques du B. Coli par ensemencement sur bouillon gélosé, observa aussi, à l'aide d'un système optique de forte puissance, des variations intéressantes à chaque phase de la poussée microbienne. Pendant la phase de latence, les bactéries ne subissaient pas de grands changements. Mais durant la phase logarithmique, leur taille avait augmenté, elles étaient très réfringentes et présentaient une vitesse de division maxima. Vers la fin de cette phase, apparurent des formes longues, prenant mal les colorations et appelées par l'auteur « grandes ombres bactériennes ». Pendant la phase suivante de la multiplication, la taille des bactéries diminuait, et il en était de même de leur vitesse de croissance. Les petites formes réapparurent mais elles étaient peu réfringentes. C'était le début de la phase de déclin.

Arthur T. Henrici (35) voulut aussi établir une relation entre les variations morphologiques des bactéries et l'âge des cultures dans lesquelles elles se développaient. Il effectua des essais sur le B. Megatherium, le Vibrion Cholérique et le B. Coli. Pour mesurer les grandeurs de ce dernier, il préparait des microphotographies qu'il agrandissait par la suite. Il constata comme Clark et Ruehl la grande différence entre les cultures jeunes et les cultures de 24 heures, ainsi que l'accroissement de la taille des microbes au cours des premières heures, surtout dans les cas des petits ensemencements. Il observa en outre que la taille des cellules augmentait avant que se fût effectuée la première division cellulaire, que dans les cultures de trois heures les éléments microbiens accentuaient un épaississement très net, et

dans la période logarithmique, les microbes augmentaient nettement de taille. Après cette phase, les tailles redevenaient normales et ne subissaient plus que des fluctuations légères, sans importance, et peut-être sans signification. L'auteur avait constaté aussi que proportionnellement à la longueur, l'accroissement en largeur était faible.

En 1932, D. S. Martin (56) étudia la morphologie du B. Coli à intervalles d'une demi-heure et remarqua que les tailles les plus grandes se rencontraient à une heure, une heure et demie, et deux heures après l'ensemencement, et que les dimensions se réduisaient dans la phase logarithmique.

En 1941, dans une étude comparative des variations de formes des bactéries, suivant la grandeur de l'ensemencement, dans un même milieu, J. Régnier et S. Lambin (69) ont trouvé que pour la culture normale du B. Coli en bouillon de viande, au cours des deux premières heures, les bacilles augmentaient aussi bien de longueur que d'épaisseur. Durant la phase logarithmique, ces bacilles diminuaient de longueur et prenaient un aspect général un peu cocobacillaire. Vers la quarante-huitième heure, le vieillissement leur donnait des « formes de souffrance, allongées, incurvées, gonflées, irrégulières, granuleuses ».

D'après A. T. Henrici, la période où l'on trouve les organismes les plus grands correspond à la division cellulaire la plus active, c'est-à-dire la phase logarithmique. Or, d'après d'autres auteurs, c'est pendant cette phase que l'on observe une réduction de la taille des bactéries. Nous ne devons pas considérer ces faits comme une contradiction. Si nous considérons comme Baruch — et c'est ce que nou savons admis pour interpréter nos résultats — que les formes courtes correspondent aux périodes de division cellulaire, il est certain que pendant la phase logarithmique où la division est

très active, nous devons trouver beaucoup de formes courtes, mais également d'autres cellules longues, celles qui sont sur le point de se diviser.

B. — *Essais personnels.*

Souche Employée.

La souche de B. Coli employée était la même que celle utilisée dans nos essais précédents.

Milieux de Culture Utilisés.

Nous avons utilisé également, pour ces essais, le milieu synthétique de Péré.

Par ailleurs, nous avons effectué une étude de la morphologie en bouillon de viande, dans le but de pouvoir comparer nos résultats avec ceux des auteurs qui nous ont précédé, et aussi avec les résultats de nos propres essais en milieu synthétique.

Essais Réalisés.

L'étude des variations morphologiques du B. Coli au cours de son développement a comporté cinq séries d'essais :

— Les deux premières ont été réalisées en dessinant les germes par la méthode de la « *chambre claire* ».

— Les deux suivantes ont été réalisées en enregistrant la morphologie des bactéries par *microphotographie.*

Ces quatre séries d'essais ont été effectuées en milieu synthétique de Péré.

— La cinquième série d'essais a été réalisée en cultivant le B. Coli en bouillon de viande et en suivant sa morphologie par microphotographie.

Techniques Employées.

Nous partions d'une culture sur gélose inclinée âgée de 18 heures. A l'aide d'une anse de platine, nous en prélevions une petite quantité que nous émulsionnions dans 50 cc. de notre milieu de culture contenu dans une petite fiole d'Erlenmeyer. Nous préparions immédiatement, sur deux lames bien dégraissées, des étalements de cette émulsion, afin de connaître l'état des microbes examinés au moment de l'ensemencement (Heure 0). Nous placions notre milieu de culture à l'étuve à 37°, et nous l'en sortions aux heures prévues pour nos expériences afin d'y effectuer des prélèvements nécessaires. Aux premières heures de nos expériences où les bactéries étaient encore peu nombreuses, nous déposions simplement une goutte de culture sur deux lames différentes et nous laissions sécher ces gouttes avant de les fixer. Les prélèvements des heures suivantes, plus chargés en germes, étaient étalés de façon uniforme, au moyen d'une pipette Pasteur. Après dessication, nous fixions les étalements à l'alcool-éther et nous les colorions par la fuchsine de Ziehl diluée pendant quelques minutes. Nous les lavions ensuite très soigneusement, afin d'obtenir des préparations rigoureusement propres, condition indispensable à l'obtention de bonnes microphotographies. L'examen des germes se faisait à l'immersion, soit par la méthode de la « chambre claire » soit par microphotographie.

1° Technique de la « chambre claire ».

Rappelons que la « chambre claire » est constituée par un prisme rhombique auquel est collé latéralement par sa face hypothénuse, un petit prisme triangulaire à angle droit. Ces deux prismes sont enfermés dans une boîte métallique que l'on adapte à l'oculaire du microscope. Par le jeu de réflexion des prismes, on peut voir en même temps les images du champ microscopique et le papier sur lequel on peut dessiner ces images.

Il suffit alors, avec une plume bien fine, de dessiner aussi exactement que possible les formes des bactéries que l'on voit projetées sur un papier placé à côté du microscope.

Connaissant le grossissement du microscope, il est facile de calculer les dimensions linéaires des bactéries dont on a dessiné l'image.

Cette méthode est, malgré tout, peu précise, étant donnée la difficulté de dessiner très exactement le contour des bactéries. Aussi lui avons-nous préféré la microphotographie qui, certes, est une technique plus compliquée et demande beaucoup plus de temps, mais qui donne des images rigoureusement fidèles des microbes.

2° Technique de la microphotographie.

a) *Description de l'appareil microphotographique.*

L'appareil que nous avons utilisé nous a été prêté par l'Institut de Physico-chimie biologique de Paris. C'est un appareil « Ernst Leitz, Wetzlar ». Il a la forme d'un tronc de pyramide dont le grand côté est ouvert et par où l'on peut engager hermétiquement les chassis renfermant des plaques photographiques. Le petit côté est constitué par le bloc de l'obturateur que termine un oculaire qui s'adapte exactement sur les statifs des microscopes « E. Leitz ». Un anneau support muni d'une vis permet de fixer immuablement l'appareil sur les statifs.

L'obturateur, à mouvement d'horlogerie, est toujours armé et donne la pose et l'instantané de 1/25e de seconde à une seconde. Il est muni latéralement d'une lunette de visée. Un prisme argenté placé au centre de l'obturateur envoie une partie du faisceau de lumière reçue de l'oculaire à la plaque à impressionner, et l'autre partie à la lunette de visée. Celle-ci est réglée de telle façon qu'elle permet de faire la mise au point en concordance exacte avec celle de la plaque. La mise

au point une fois réalisée, on déplace le prisme à l'aide d'un déclencheur. La lumière vient alors, en totalité, impressionner la plaque. Il suffit, au moyen d'un deuxième déclencheur, d'ouvrir l'obturateur et de le laisser ouvert pendant le temps voulu.

b) *Prise de vue et développement des épreuves.*

Pour nos prises de vue, nous avons adopté un temps de pose de 3 à 4 minutes, selon que les étalements colorés étaient plus ou moins opaques.

Comme source lumineuse, nous nous sommes servi d'une lampe loupe placée à une dizaine de centimètres du miroir du microscope. Le microscope employé était un « Ernst Leitz, Wetzlar ».

Nous avons utilisé les plaques Guilleminot « Grapho Brom » et du papier « Spécial contraste Crumière » (demi-brillant) qui nous ont donné toute satisfaction. Les plaques et les papiers ont été développés selon la technique photographique courante, dans une chambre noire à la lumière rouge. Nous rappelons ci-dessous sommairement le protocole des développements.

Les plaques ou papiers étaient :

1° Plongés dans un bain révélateur jusqu'à apparition suffisante des images. Le révélateur était préparé selon la formule suivante :

Eau.	1.000 gr.
Génol.	3 —
Hydroquinone.	7 —
Sulfite de soude anhydre	60 —
Carbonate de soude anhydre . .	50 —
Bromure de potassium.	1 —

2° Lavés à l'eau du robinet pendant quelques secondes.

3° Trempés ensuite dans un bain fixateur jusqu'à fixation complète (environ dix minutes). Le fixateur était constitué par :

Hyposulfite de soude.	250 gr.
Métabisulfite de soude	25 —
Eau distillée q.s.p.	1.000 cc.

4° Les plaques où les papiers étaient enfin lavés à l'eau courante, ou fréquemment renouvelée, pendant une demi-heure environ, puis séchés.

c) *Mesure du grossissement de l'appareil microphotographique et du microscope.*

Pour connaître le grossissement du système microscope combiné à l'appareil microphotographique, nous avons pris une photographie d'une lame micrométrique, exactement dans les mêmes conditions que lorsque nous prenions des photographies des lames de microbes.

La lame micrométrique comportait 20 graduations, s'échelonnant sur une longueur totale de 2 millimètres; la distance de deux graduations mesurait donc 1/10e de millimètre. Chacune de ces parties était encore subdivisée en dix petites divisions égales. La distance de deux petites divisions mesurait donc 1/100e de millimètre.

Nous mesurions, sur la photographie de la lame micrométrique, la distance de deux grands traits dont la longueur réelle était de 1/10e de millimètre. Nous l'avons trouvée égale à 76 mm. 6 - 76 mm. 7. Le grossissement du système optique combiné de l'appareil microphotographique et du microscope était donc de 766-767, soit très approximativement 1.000/1,3 (ceci pour faciliter les calculs des longueurs réelles des microbes).

d) *Mensuration des microbes et calcul de leurs longueurs réelles.*

A l'aide d'un papier millimétré, nous mesurions toutes les images nettes des microbes de chaque photographie en laissant de côté celles qui étaient floues (le microscope ne donnant pas une netteté homogène en tous les points d'un même champ).

Connaissant les longueurs agrandies des bactéries et le grossissement G de l'appareil microphotographique et du microscope, il était facile de déterminer leurs longueurs naturelles.

Soit : x millimètres, la longueur mesurée, la longueur naturelle correspondante était :

$$\frac{x}{G} = \frac{x}{\frac{1.000}{1,3}} = \frac{x.1,3}{1.000} \text{ millimètres ou } x.1^{\mu},3$$

Résultats Obtenus.

Etant donnée la difficulté de reproduire fidèlement la forme des germes par la méthode de la « chambre claire », nous n'avons pas apprécié avec précision les résultats obtenus avec cette méthode. Nous nous sommes contenté d'examiner les variations de la taille des germes à l'œil nu, sans effectuer de mensurations précises.

Nous avons examiné de plus près les résultats fournis par la microphotographie. Nous avons fait des mesures précises, et groupé ces résultats sous forme de tableaux, puis construit des courbes de variations morphologiques.

Examinons successivement les résultats fournis par ces deux techniques :

1° Résultats obtenus par la méthode de la « chambre claire »

Essai 1

Le premier essai morphologique a été effectué parallèlement à une expérience de numération du B. Coli cultivé en milieu synthétique de Péré. Il a donc été suivi aux heures suivantes :

0, 5, 8, 24, 48 et aux quatrième et septième jours après l'ensemencement.

Nous avons dit plus haut que nous avions apprécié ces résultats seulement à l'œil nu, sans effectuer de mensurations précises.

Nous avons donc observé les faits suivants :

— De l'heure 0 à la deuxième heure : les microbes semblaient devenus plus grêles.

— A la cinquième heure, ils étaient devenus plus gros et légèrement plus longs. Mais nous avons observé également des formes courtes.

— A la huitième heure, les microbes dans l'ensemble étaient encore longs, mais moins gros qu'à la cinquième heure.

A la vingt-quatrième heure, les épaisseurs avaient diminué. Certains microbes avaient retrouvé leur taille de l'heure 0. Mais d'autres continuaient à s'allonger.

— A la quarante-huitième heure, les épaisseurs étaient inchangées. Nous observions davantage de formes longues (formes de vieillissement).

— Au quatrième jour, nous retrouvions encore des formes longues, mais aussi des formes granuleuses; l'épaisseur des germes n'avait pas varié.

— Au septième jour, les microbes étaient devenus plus grêles; les formes granuleuses dominaient nettement.

Dans l'ensemble, nous remarquions que les formes les plus nettes se rencontraient aux cinquième et huitième heures, et qu'à partir de la vingt-quatrième heure, l'allongement devenait continuel, ce qui nous conduisait jusqu'aux formes granuleuses, formes de fatigue et de vieillesse.

L'écart des heures d'examen étant trop grand, nous n'avons pas obtenu de résultats concluants au cours de ce premier essai.

Essai 2

Afin de suivre de plus près les variations morphologiques du B. Coli, nous avons effectué dans cet essai,

des prélèvements dans la culture, toutes les demi-heures, de l'heure 0 à l'heure 8.

Nous avons alors observé les faits suivants :

— Une demi-heure et une heure après l'ensemencement, nous remarquions que les microbes étaient devenus un peu plus grêles qu'à l'heure 0.

— Une heure et demie, après, les microbes étaient encore grêles.

— A la deuxième heure, les germes avaient retrouvé leur état initial. Nous remarquions un commencement d'allongement.

— 2 h. 30 après l'ensemencement, l'état général restait sensiblement le même, avec quelques formes courtes (formes de division).

— A la troisième heure, nous observions les mêmes formes longues, avec davantage de formes courtes.

— 3 h. 30 après l'ensemencement, les microbes s'allongeaient un peu plus, mais il restait encore des formes courtes.

— A la quatrième heure, les formes courtes devenaient moins nombreuses; les microbes s'allongeaient davantage.

— 4 h. 30 après l'ensemencement, nous retrouvions les mêmes formes longues, mais les microbes étaient devenus un peu plus épais.

— A la cinquième heure, les microbes s'épaississaient davantage; leurs longueurs avaient légèrement diminué.

— 5 h. 30 après l'ensemencement, les microbes s'allongeaient de nouveau; leurs épaisseurs restaient inchangées; quelques formes courtes.

— A la sixième heure, pas de grands changements.

— 6 h. 30 après l'ensemencement, les microbes s'épaississaient encore davantage et s'allongeaient un peu plus; quelques formes courtes.

— A la septième heure, les longueurs restaient les mêmes; les épaisseurs avaient légèrement diminué .

— 7 h. 30 après l'ensemencement, les épaisseurs

avaient nettement diminué, les longueurs légèrement; quelques formes courtes.

— A la huitième heure, les microbes s'épaississaient et s'allongeaient légèrement; davantage de formes courtes.

L'examen effectué à des heures rapprochées nous montrait que les microbes subissaient des variations continuelles dans leur morphologie au cours de leur développement. Nous verrons plus loin dans nos séries d'essais réalisées par microphotographie que les nombreuses fluctuations morphologiques coïncident avec les phases de multiplication active des microbes.

2° Résultats obtenus par la technique de microphotographie.

Nous avons effectué, pour étudier les variations morphologiques du B. Coli, trois séries d'expériences par la technique microphotographique. Dans les deux premières, le B. Coli était cultivé en milieu synthétique de Péré, et dans la troisième, en bouillon de viande. Dans ces trois séries d'expériences, la morphologie des germes a été examinée aux heures suivantes, après l'ensemencement : 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24, 48, et aux quatrième et septième jours de culture.

A chacun de ces temps, nous prenions deux photographies des germes présents dans les prélèvements. Sur chaque photographie, nous mesurions ensuite le plus grand nombre d'images nettes possibles, et nous calculions le pourcentage des germes de chaque longueur.

Nous avons groupé sous forme de tableaux ces différents résultats :

Dans les tableaux XII, XIII, XIV, nous avons respectivement reporté les résultats des essais n°s 3 et 4 effectués en milieu synthétique, et les résultats de l'essai n° 5, réalisé en bouillon de viande.

TABLEAU XII

Étude des variations morphologiques du B. Coli (cultivé en milieu synthétique de Péré). Résultats de l'essai n° 3, réalisé par microphotographie.

Heures de culture à 37°	Nombres de microbes comptés	Longueurs mesurées en mm	Longueurs naturelles en μ	Pourcentages des germes de chaque longueur
0	100	1 mm	1μ3	50%
	70	1,5	2	35
	32	2	2,6	15
1	200	1	1,3	88,8
	20	1,5	2	8,8
	5	2	2,6	2,2
2	200	1	1,3	64,5
	90	1,5	2	29
	20	2	2,6	6,5
3	30	1	1,3	11
	210	1,5	2	76,6
	34	2	2,6	12,4
4	4	1	1,3	11
	27	1,5	2	75
	5	2	2,6	14
5	20	1	1,3	20
	50	1,5	2	50
	30	2	2,6	30
6	30	1	1,3	13
	100	1,5	2	43,5
	100	2	2,6	43,5
7	30	1	1,3	11,76
	150	1,5	2	58,80
	70	2	2,6	27,45
	5	2,5	3,25	2
8	10	1	1,3	8
	50	1,5	2	40,6
	50	2	2,6	40,6
	10	2,5	3,25	8
	3	3	3,90	2,4
9	10	1	1,3	3
	100	1,5	2	29,5
	200	2	2,6	58
	20	2,5	3,25	6
	6	3	3,90	2
	2	4	5,20	0,6
10	10	1 mm	1μ3	3,86
	100	1 5	2	38,60
	140	2	2,6	54
	5	2,5	3,25	1,93
	2	3	3,90	0,80
	2	3,5	4,55	0,80
11	15	1	1,3	7,85
	100	1,5	2	52,35
	50	2	2,6	26,18
	10	2,5	3,25	5,23
	10	3	3,90	5,23
	3	3,5	4,55	1,57
	3	4	5,20	1,57
12	6	1	1,3	2,70
	100	1,5	2	44,84
	100	2	2,6	44,84
	12	2,5	3,25	5,40
	5	3	3,90	2,24
24	5	1	1,3	3,81
	30	1,5	2	22,90
	50	2	2,6	38,15
	20	2,5	3,25	15,26
	10	3	3,90	7,63
	5	3.5	4,55	3,81
	8	4	5,20	6,10
	3	5	6,50	2,30
48	10	1	1,3	5,8
	50	1,5	2	29
	60	2	2,6	34,80
	Quelq. uns	2,5	3,25	faible
	30	3	3,90	17,40
	20	4	5,20	11,60
	Quelq. uns	5	6,50	faible
	id.	6	7,80	id.
	»	»	»	»
	»	»	»	»
	»	11	14,30	»
	»	12	15,60	»

4e *jour.* — Dimensions très variables; les formes longues dominent; beaucoup de formes filamenteuses et granuleuses.

7e *jour.* — Les filaments et les granulations dominent ; quelques formes filamenteuses très longues.

TABLEAU XIII

Étude des variations morphologiques du B. Coli (cultivé en milieu synthétique de Péré). Résultats de l'essai n° 4, réalisé par microphotographie.

Heures de culture à 37°	Nombres de microbes comptés	Longueurs mesurées en mm	Longueurs naturelles en μ	Pourcentages des germes de chaque longueur
0	200	1mm	1μ3	72%
	80	1,5	2	28
1	40	0,5	0,65	66,5
	20	1	1,3	33,5
2	18	0,5	0,65	64
	10	1	1,3	36
3	36	0,5	0,65	42
	50	1	1,3	58
4	33	0,5	0,65	34
	63	1	1,3	66
5	60	0,5	0,65	57
	45	1	1,3	43
6	50	0,5	0,65	22
	180	1	1,3	78
7	20	0,5	0,65	13
	120	1	1,3	78
	14	1,5	2	9
8	34	0,5	0,65	39
	44	1	1,3	50
	10	1,5	2	11
9	36	0,5	0,65	24
	100	1	1,3	67
	12	1,5	2	9
10	12	0mm5	0μ65	8%
	130	1	1,3	80
	20	1,5	2	12
11	20	0,5	0,65	11
	140	1	1,3	81
	12	1,5	2	8
12	16	0,5	0,65	13
	100	1	1,3	81
	7	1,5	2	6
24	10	0,5	0,65	9
	80	1	1,3	73
	20	1,5	2	18
36	100	1	1,3	41
	100	1,5	2	41
	40	2	2,6	16
	5	3	3,90	2
48	40	1	1,3	20
	100	1,5	2	50
	60	2	2,6	30
	20	3	3,90	10

4e *jour.* — Dimensions très variables, les formes longues dominent; quelques formes filamenteuses et granuleuses.

7e *jour.* — Les formes filamenteuses et granuleuses dominent.

TABLEAU XIV

Étude des variations morphologiques du B. Coli (cultivé en bouillon de viande).
Résultats de l'essai n° 5, réalisé par microphotographie.

Heures de culture à 37°	Nombres de microbes comptés	Longueurs mesurées en mm	Longueurs naturelles en μ	Pourcentages des germes de chaque longueur
0	70 30	1,5 2	2μ 2,6	70% 30
1	70 30	1,5 2	2 2,6	70 30
2	50 65	1,5 2	2 2,6	43 57
3	20 140	1,5 2	2 2,6	12,5 87,5
4	100 20	1,5 2	2 2,6	83 17
5	100 20	1,5 2	2 2,6	83 17
6	120 18	1,5 2	2 2,6	87 13
7	110 33	1,5 2	2 2,6	77 23
8	100 40	1,5 2	2 2,6	71 29
9	120 48	1,5 2	2μ 2,6	71% 29
10	140 35	1,5 2	2 2,5	80 20
11	125 25	1.5 1	2 2,6	83 17
12	120 18	1,5 2	2 2,6	87 13
24	100 40 12	1,5 2 2,5	2 2,6 3,25	65 26 9
36	120 48 48 24	1,5 2 2,5 3&4	2 2,6 3,25 4&5	50 20 20 10
48	100 40 40 20	1,5 2 2,5 3&4	2 2,6 3,25 4&5	50 20 20 10

4e *Jour.*— Dimensions très variables quelques formes filamenteuses et granuleuses.

7e *Jour.*— Les formes filamenteuses et granuleuses dominent.

a. — *Interprétation des résultats obtenus par microphotographie.*

Pour interpréter nos résultats, nous considérons comme Baruch (6) qu'il y a division cellulaire chaque fois qu'il y a prédominance de formes courtes, ou chaque fois que les formes courtes augmentent au détriment des formes longues, ou — ce qui revient au même — chaque fois qu'il y a un raccourcissement de la taille des germes. Ce raccourcissement doit être compris dans un sens relatif. En effet, quand nous parlons de raccourcissement, il s'agit d'un raccourcissement par rapport aux tailles du temps précédemment observé. Les tailles correspondant à cette période de raccourcissement pourraient cependant être plus grandes que celles observées pendant une autre période d'allongement.

Examinons maintenant de plus près les résultats obtenus au cours de nos essais.

Etude détaillée de l'essai n° 3.

Nous allons examiner de près, heure par heure, les variations morphologiques du B. Coli observées au cours d'un de nos essais, l'essai n° 3 par exemple (v. Tableau XII).

Heure 0. — Au début de l'ensemencement, nous avions :

50 %	de germes de	1 µ 3
35 —	—	2 µ
15 —	—	2 µ 6

Nous avions donc une majorité de germes de 1µ,3, mais dans l'ensemble, les longueurs étaient assez inégales. Les germes présentaient des formes nettes, et une certaine épaisseur.

Première heure. — Une heure après nous observions les proportions suivantes :

88,8 % de germes de . . . 1 μ 3
8,8 — — . . . . 2 μ
2,4 — — . . . 2 μ 6

Ici, les formes courtes dominaient nettement. Les microbes étaient devenus en même temps plus grêles, semblant s'être « ratatinés », ce qui pourrait être le fait d'une adaptation difficile au milieu synthétique.

Deuxième heure. — Deux heures après l'ensemencement, les formes courtes (1μ,3) dominaient toujours, mais moins qu'à la première heure. Les proportions des formes de 2μ et de 2μ,6 avaient augmenté. Les formes de 2μ s'élevaient, numériquement, presqu'à la moitié des formes de 1μ,3. Nous avions en effet :

61,5 % de germes de . . . 1 μ 3
29 — — . . . 2 μ
6,5 — — . . . 2 μ 6

Cette période comprise entre la première et la deuxième heure était donc une période d'allongement des germes.

Troisième et quatrième heure. — Nous observions à la troisième heure :

11 % de germes de . . . 1 μ 3
76,6 — — . . . 2 μ
12,4 — — . . . 2 μ 6

et à la quatrième heure :

11 % de germes de . . . . 1 μ 3
75 — — . . . . 2 μ
14 — — . . . . 2 μ 6

Le déplacement du pourcentage maximum se faisait donc nettement vers les germes de 2μ; les formes de 2μ,6 avaient augmenté aussi. Il y avait donc allongement

général des germes. Les épaisseurs avaient augmenté simultanément pendant ces deux heures.

Cinquième heure. — Les germes continuaient à s'allonger, les formes de 2μ,6 s'élevaient jusqu'à 30 %. Les formes de 2μ qui dominaient toujours ,avaient cependant diminué légèrement (50 % au lieu de 75 %), à l'avantage des formes courtes de 1μ,3 qui passaient alors de 11 % à 20 %.

Ces valeurs semblaient traduire une période de division cellulaire faible.

Les épaisseurs restaient inchangées.

Sixième heure. — Les microbes continuaient à s'allonger. Nous comptions :

13 %	de germes de	1 μ 3
43 —	—	2 μ
43 —	—	2 μ 6

Les épaisseurs avaient légèrement diminué.

Septième heure. — Nous avions à la septième heure :

11,70 %	de germes de . . .	1 μ 3
58,80 —	— . . .	2 μ
27,50 —	— . . .	2 μ 6
2 —	— . . .	3 μ 25

Il y avait apparition des formes dépassant 3μ. Les formes de 2μ,6 avaient diminué au bénéfice des formes de 2μ. Il y avait donc un raccourcissement relatif des germes, et par conséquent division cellulaire. Les épaisseurs restaient les mêmes qu'à la sixième heure.

Dans l'ensemble, depuis le début de l'ensemencement jusqu'à la septième heure, les microbes avaient augmenté de longueur. A partir de la huitième heure, les formes de 1μ,3 étaient devenus très rares, donc moins intéressants; nous les avions laissées de côté et nous avions examiné les variations morphologiques d'après les fluctuations des formes de 2μ, de 2μ,6 et de 3μ,25.

Huitième heure. — Nous observions un léger allongement; nous avions en effet :

40,60 % de germes de . . . 2 µ
40,60 — — . . . 2 µ 6
8 — — . . . 3 µ 25

Les microbes étaient devenus plus gros.

Neuvième heure. — Les résultats à cette heure étaient :

29,50 % de germes de . . . 2 µ
58 — — . . . 2 µ 6
6 — — . . . 3 µ 25
quelques formes de 4µ et 5µ.

Nous remarquions qu'il y avait un léger allongement (augmentation des formes de 2µ,6). Mais cette augmentation était en partie réalisée au détriment des formes de 3µ,25. Il y avait donc eu un raccourcissement relatif des germes, et par conséquent, une division cellulaire faible. Les épaisseurs restaient inchangées.

Dixième heure. — Nous avions à la dixième heure :

38,60 % de germes de . . . 2 µ
54 — — . . . 2 µ 6
1,90 — — . . . 3 µ 25

Les formes de 2µ,6 se maintenaient à peu près au même pourcentage qu'à l'heure précédente; par contre, les formes courtes de 2µ avaient augmenté.

Il y avait donc eu division cellulaire.

Les épaisseurs avaient également diminué.

Onzième heure. — Nous observions encore une augmentation de formes courtes, malgré l'allongement de certains germes :

52,35 % de germes de . . . 2 µ
26,20 — — . . . 2 µ 6
13 — — . . . 3 à 4 µ

Nous avions donc encore une division cellulaire. Les épaisseurs avaient augmenté.

Douzième heure. — La douzième heure nous donnait :

44,85 % de germes de . . . 2 µ
44,85 — — . . . 2 µ 6
7,60 — — . . . 3 à 4 µ

Les formes de 2µ,6 avaient augmenté au détriment des formes courtes de 2µ, mais aussi au détriment des formes longues de 3 à 4µ.

Il y avait donc un raccourcissement relatif des germes, et par conséquent une division cellulaire faible.

Les épaisseurs avaient légèrement augmenté.

Vingt-quatrième heure. — Les formes de 2µ et 2µ,6 diminuaient; par contre, les proportions des formes longues (3 — 4µ et plus) augmentaient notablement; quelques formes de 6µ,5.

Les épaisseurs avaient diminué par rapport à la douzième heure. Elles restaient inchangées jusqu'au septième jour.

Quarante-huitième heure. — Les proportions restaient sensiblement les mêmes qu'à la vingt-quatrième heure.

Nous remarquions que des formes très longues commençaient à apparaître, mesurant jusqu'à 14µ — 15µ.

Quatrième jour. — Nous observions encore toutes les dimensions. Les formes filamenteuses et granuleuses faisaient leur apparition.

Septième jour. — Les formes filamenteuses et granuleuses dominaient. Nous avions observé également quelques filaments très longs.

Nous avons groupé ci-dessous, sous forme de tableau récapitulatif (Tableau XV), les interprétations précédentes. Dans ce tableau sont indiqués, d'heure en heure,

les périodes d'allongement et de raccourcissement des germes, et les périodes de division cellulaire correspondantes.

TABLEAU XV

Étude des variations morphologiques du B. Coli (cultivé en milieu synthétique de Péré). Interprétation des résultats de l'essai n° 3.

HEURES de culture à 37°	VARIATIONS MORPHOLOGIQUES	INTERPRÉTATIONS
0 à 1	Raccourcissement et ratatinement général.	Adaptation au milieu.
1 à 2	Allongement général.	
2 à 3	Allongement général.	
3 à 4	Allongement général.	
4 à 5	Raccourcissement de certains germes.	Division faible.
5 à 6	Allongement de certains autres.	
6 à 7	Raccourcissement général.	Division importante.
7 à 8	Allongement général.	
8 à 9	Raccourcissement de certains germes. Allongement de certains autres.	Division faible.
9 à 10	Raccourcissement de certains germes.	Division faible.
10 à 11	Raccourcissement général.	Division importante.
11 à 12	Allongement de certains germes. Raccourcissement de certains autres.	Division faible.
12 à 24	Allongement général.	
24 à 48	Augmentation des formes filamenteuses et granuleuses.	Plus de signification.

De la même façon, nous avons dressé des tableaux récapitulatifs (Tableaux XVI et XVII), où sont respectivement résumées les interprétations des résultats de nos séries d'essais n°s 4 et 5.

TABLEAU XVI

Étude des variations morphologiques du B. Coli (cultivé en milieu synthétique de Péré).

Interprétation des résultats de l'essai n° 4.

HEURES de culture à 37°	VARIATIONS MORPHOLOGIQUES	INTERPRÉTATIONS
0 à 1	Raccourcissement et ratatinement général.	Adaptation au milieu.
1 à 2	Allongement général.	
2 à 3	Allongement général.	
3 à 4	Raccourcissement de certains germes. Allongement de certains autres.	Division faible.
4 à 5	Raccourcissement général.	
5 à 6	Allongement général.	
6 à 7	Allongement général.	
7 à 8	Raccourcissement général.	Div. importante.
8 à 9	Allongement de certains germes. Raccourcissement de certains autres.	Division faible.
9 à 10	Allongement général.	
10 à 11	Raccourcissement général.	Div. importante.
11 à 12	Raccourcissement général.	Div. importante
12 à 24	Allongement général.	
24 à 48	Augmentation des formes filamenteuses et granuleuses.	Plus de signification.

TABLEAU XVII

Étude des variations morphologiques du B. Coli (cultivé en bouillon de viande)

Interprétation des résultats de l'essai n° 5.

HEURES de culture à 37°	VARIATIONS MORPHOLOGIQUES	INTERPRÉTATIONS
0 à 1	Sans changement.	
1 à 2	Allongement partiel. Raccourcissement de certains germes.	Division faible.
2 à 3	Allongement général.	
3 à 4	Raccourcissement général.	Div. importante.
4 à 5	Raccourcissement général.	Div. importante.
5 à 6	Raccourcissement général.	Div. importante.
6 à 7	Allongement général.	
7 à 8	Allongement de certains germes. Raccourcissement de certains autres.	Division faible.
8 à 9	Sans changement.	
9 à 10	Raccourcissement de certains germes.	Division faible.
10 à 11	Raccourcissement général.	Div. importante.
11 à 12	Raccourcissement général.	Div. importante.
12 à 24	Allongement général.	
24 à 48	Augmentation des formes filamenteuses et granuleuses.	Plus de signification.

b. — ***Comparaison des résultats obtenus dans l'étude des variations morphologiques du B. Coli, cultivé en milieu synthétique et en bouillon de viande.***

Si nous examinons de près les trois tableaux récapitulatifs précédents, nous remarquons d'abord qu'il existe une certaine similitude entre les résultats des essais en milieu synthétique, présentés dans les tableaux XIV et XV. Nous avons observé dans ces deux essais, à la première heure de culture, un raccourcissement et un ratatinement général des germes, fait que nous avons supposé être la cause d'une adaptation difficile des microbes dans le milieu synthétique.

Le raccourcissement des germes dû à une division cellulaire a été observé dans les deux essais vers la quatrième et la cinquième heure.

A partir de ce moment, les périodes de raccourcissement et d'allongement des germes alternaient sans interruption jusqu'à la douzième heure.

Si nous comparons ces résultats avec ceux du tableau XVI traduisant les résultats de l'essai effectué en bouillon de viande, nous remarquons qu'à la première heure, dans ce dernier milieu, les microbes ne subissaient pas de variations morphologiques. La question d'adaptation ne se poserait pas pour eux dans ce milieu naturel.

Le raccourcissement des germes dû à un début de division cellulaire, s'est produit plus tôt dans le bouillon de viande, vers la deuxième heure, au lieu de la quatrième ou cinquième heure dans le milieu synthétique.

Puis les périodes de raccourcissement et d'allongement des germes alternaient, comme nous l'avions remarqué dans le cas du milieu synthétique.

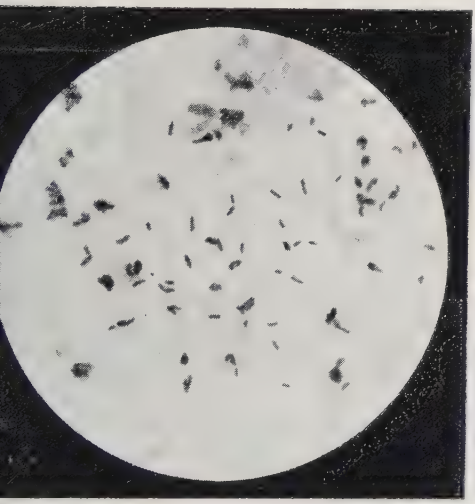
Nous reproduisons ci-dessous quelques-unes des photographies que nous avons obtenues. Nous avons réalisé une centaine d'épreuves photographiques qu'il nous est

Colibacilles cultivés :

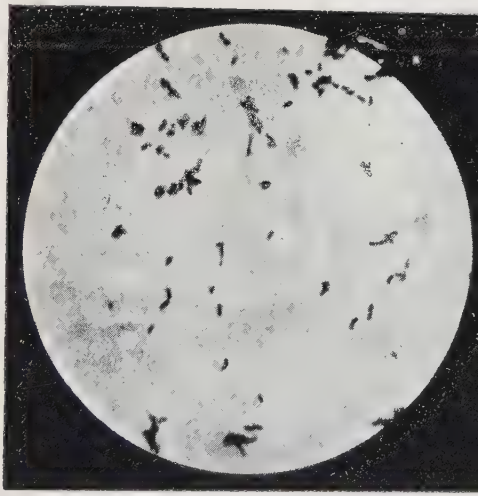
En milieu synthétique.

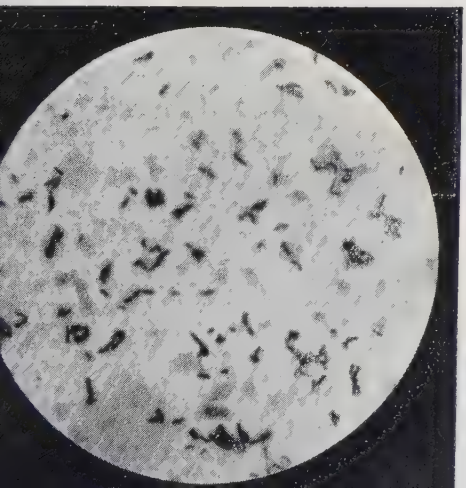
En bouillon de viande.

Heure 0



1re Heure



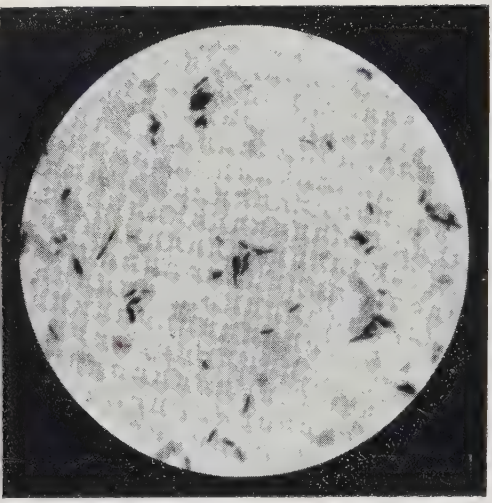


2e Heure

Colibacilles cultivés :

En milieu synthétique.

En bouillon de viande.



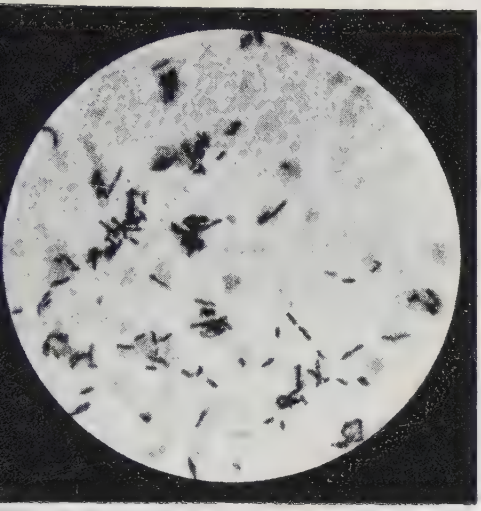
5ᵉ Heure

8ᵉ Heure

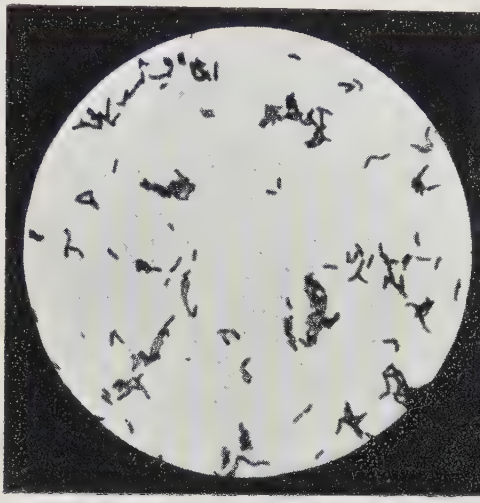
Colibacilles cultivés :

En milieu synthétique.

En bouillon de viande.



12e Heure

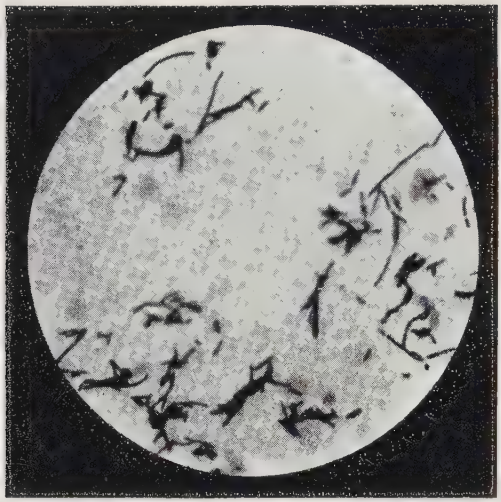


24e Heure

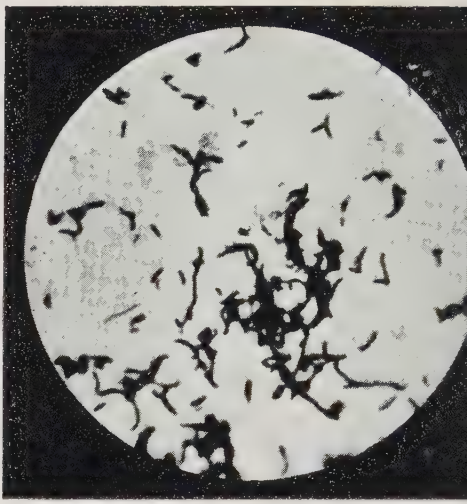
Colibacilles cultivés :

En milieu synthétique.

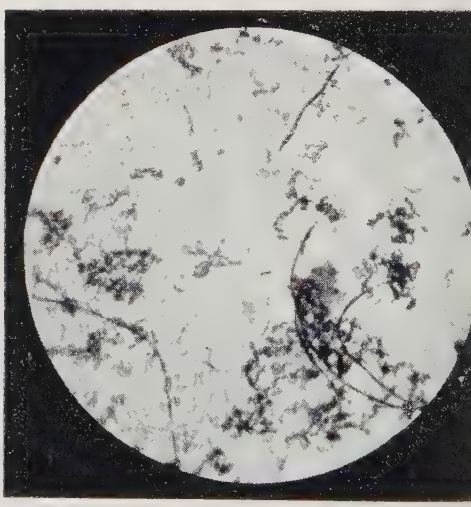
En bouillon de viande.



48e 36e
Heure



4e 7e
Jour



impossible de reproduire ici en totalité. Nous en présentons quelques-unes à titre d'exemple. Afin de faciliter les comparaisons, nous avons placé côte à côte les clichés obtenus, à la même heure de culture, d'une part en milieu synthétique et d'autre part en bouillon de viande.

c. — *Interprétation des courbes traduisant les résultats précédents.*

Afin de rendre les résultats précédents plus apparents, nous les avons portés sous forme de courbes exprimant les pourcentages des germes de chaque longueur en fonction de l'âge de la culture. Sur ces courbes sont donc portés en abscisses : les différentes heures de culture, et en ordonnées : les chiffres correspondant aux pourcentages notés.

Nous avons vu précédemment que le B. Coli se comportait morphologiquement d'une façon à peu près identique en milieu synthétique et en bouillon de viande. En dehors du ratatinement observé en milieu synthétique à la première heure et dû très vraisemblablement à une adaptation à ce milieu, et en dehors du raccourcissement des germes correspondant à un commencement de division cellulaire, observé plus tôt en bouillon qu'en milieu synthétique, les fluctuations morphologiques étaient sensiblement les mêmes dans les deux milieux.

Afin de ne pas rendre les interprétations fastidieuses, nous avons pris en considération la similitude des résultats de nos trois essais et nous avons examiné seulement l'un d'eux, d'après les courbes que nous en avons construites.

Nous avons pris comme exemple l'essai n° 3 dont nous avons fait l'étude détaillée plus haut. Nous avons construit six courbes (fig. 10) traduisant les résultats de cet essai :

— *Une courbe traduisant l'épaisseur* des germes aux différentes heures de culture;

— *Cinq courbes dont chacune traduit les pourcentages des germes d'une même longueur,* aux différentes heures de culture.

Les variations des épaisseurs, à une heure quelconque de la culture, étaient sensiblement les mêmes pour tous les microbes, et d'ailleurs assez faibles. Comme ces variations se prêtaient très difficilement à une mesure exacte, nous avons construit la courbe les représentant, non pas d'après des mensurations précises, mais d'après une simple appréciation à l'œil nu.

Les courbes représentant les pourcentages des germes de même longueur sont au nombre de cinq :

1° Une courbe traduisant le pourcentage des germes de 1μ,3, aux différentes heures de culture, et qui étaient les formes les plus fréquentes au début de notre expérience;

2° Une courbe de pourcentage des germes de 2μ;

3° Une courbe de pourcentage des germes de 2μ,6. C'étaient les deux formes dominantes au cours de notre expérience;

4° Une courbe de pourcentage des germes de 3 à 4μ. Ces formes faisaient leur apparition à la septième heure et présentaient avec les deux précédentes des fluctuations intéressantes, à partir de cette heure de culture;

5° Enfin une courbe de pourcentage des germes de 4μ et plus, qui étaient, en fait, des formes de vieillesse, présentant pour nous peu d'intérêt.

Nous allons examiner maintenant, de plus près, successivement, ces différentes courbes, en interprêtant en même temps leurs variations.

1° *Courbe de pourcentage des germes de* 1μ,3.

La courbe monte d'abord de l'heure 0 à la première heure, pour descendre ensuite très bas, jusqu'à la troisième heure, où elle subit de petites fluctuations.

Il y avait donc plus de formes courtes une heure après

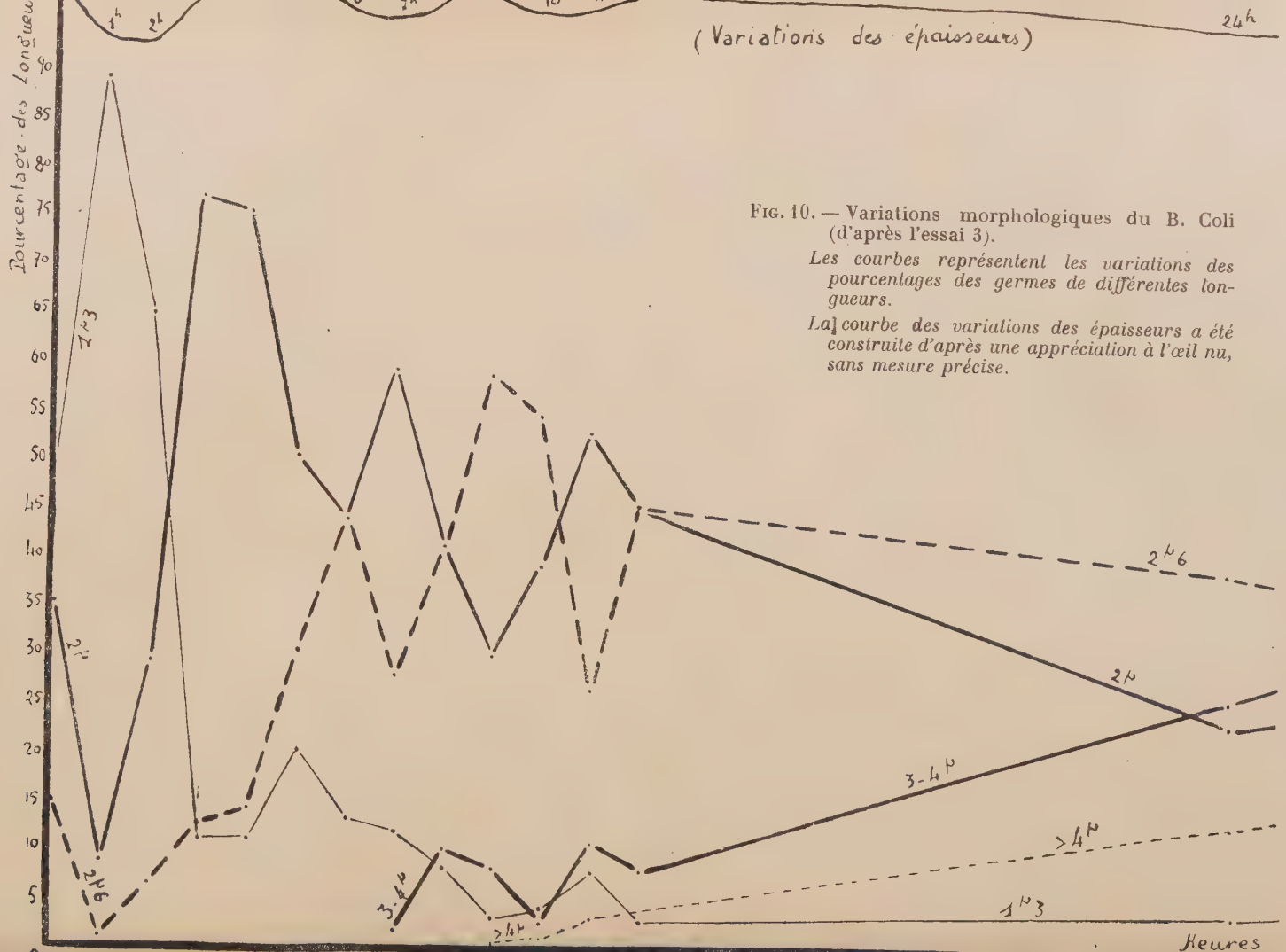


FIG. 10. — Variations morphologiques du B. Coli (d'après l'essai 3).

Les courbes représentent les variations des pourcentages des germes de différentes longueurs.

La courbe des variations des épaisseurs a été construite d'après une appréciation à l'œil nu, sans mesure précise.

l'ensemencement, dans le milieu synthétique, qu'au départ de la culture. Nous avons vu que ceci pouvait être interprêté comme correspondant à une adaptation des microbes au milieu synthétique, hypothèse qui s'est confirmée par la diminution de l'épaisseur des germes pendant cette première heure.

Ces résultats concordent avec ceux des essais n^{os} 1 et 2 réalisés avec la « chambre claire ».

Le pourcentage des formes courtes diminue ensuite très vite. En effet, les microbes une fois habitués au nouveau milieu ont repris leur vigueur. Les formes oscillent alors entre 2μ et 2μ,6.

2° et 3° *Courbes de pourcentage des germes de* 2μ *et de* 2μ,6.

Nous examinons en même temps les courbes correspondant aux germes de 2μ et de 2μ,6, car ces deux courbes présentent entre elles des fluctuations intéressantes.

Nous remarquons d'abord une certaine similitude entre ces deux courbes de l'heure 0 à la troisième heure. Le pourcentage des germes de 2μ et de 2μ,6 diminue de l'heure 0 à la première heure, puis augmente de la première à la troisième heure (en sens inverse de la courbe des germes de 1μ,3). Ceci ne peut en être autrement : pendant la période d'adaptation, les formes longues diminuaient au profit des formes courtes; puis quand les microbes reprenaient leur vigueur, les premières formes augmentaient au détriment des dernières.

A partir de la troisième heure et jusqu'à la douzième heure, les courbes des formes de 2μ et de 2μ,6 varient toujours en sens inverse l'une de l'autre.

La courbe des formes de 2μ descend de la quatrième heure à la cinquième heure à l'inverse de celle des formes de 2μ,6, mais en même temps à l'inverse de celle des formes de 1μ,3. Il y avait donc un raccourcissement de certains germes et par conséquent une division cellulaire faible.

Elle monte de la sixième à la septième heure, pendant que celle des 2μ,6 descend. Il y avait encore pendant cette période un raccourcissement des germes, donc une division cellulaire.

Il en est de même de la neuvième à la onzième heure.

A partir de la douzième heure, les courbes des formes de 2μ et de 2μ,6 descendent, la première assez vite et la deuxième plus doucement, et ceci au profit de la courbe des formes plus longues (3μ — 4μ) ainsi que celle des formes de vieillissement (4μ et plus).

4° *Courbe de pourcentage des germes de* 3μ *à* 4μ.

Les formes longues apparaissaient en grand nombre vers la septième heure.

La courbe qui les représente monte de la septième à la huitième heure; elle descend de la huitième à la neuvième heure, au profit de celle des 2μ. Celle-ci est descendante pendant cette période, mais le rythme est moins accentué qu'à l'heure précédente. Il y avait donc un raccourcissement de certains germes de la huitième à la neuvième heure, et par conséquent une division cellulaire faible.

La courbe des 3μ — 4μ descend encore de la neuvième à la dixième heure, à l'inverse de celle des 2μ. Il y avait encore une division cellulaire pendant cette période.

Entre la onzième et la douzième heure, la courbe des 3μ — 4μ descend, en même temps que celle des 2μ, pendant que celle des formes intermédiaires (2μ,6) monte. Il y avait donc une division cellulaire faible.

5° *Courbe de pourcentage des germes de* 4μ *et plus.*

C'est la courbe des formes de vieillissement, formes qui apparaissaient vers la neuvième ou dixième heure, d'abord en petit nombre puis en proportions croissantes.

Nous n'insistons pas sur ces formes qui présentent pour nous peu d'intérêt.

d. — *Relations entre les périodes de division des germes et les diverses phases de leur multiplication.*

Afin de voir si notre interprétation des périodes de division cellulaire, établie d'après l'observation morphologique, correspondait bien à la réalité, nous avons examiné ces périodes de division cellulaire par rapport aux diverses phases de la multiplication microbienne et par rapport au « temps de génération » des germes, à ces diverses phases.

Calcul du « temps de génération ». — Ce « temps de génération » a été déterminé d'après la technique classique de H. Buchner, K. Longard et G. Riedlin (13).

Si nous connaissions le nombre de microbes au début et à la fin d'une expérience, nous pourrions calculer le nombre de bipartitions effectuées pendant ce temps donné, et par conséquent la durée d'une bipartition, c'est-à-dire le temps nécessaire à la formation d'une nouvelle génération. Ce temps est appelé : *temps de génération.*

Calculons par exemple le nombre de bipartitions (ou de générations) accomplies pendant une période de H. heures :

Soient a le nombre de microbes au début, et b le nombre de microbes à la fin de cette période;

Soit x le nombre de bipartitions effectuées;

Après une bipartition, nous avons $a \times 2$ microbes;

Après 2 bipartitions, nous avons $a \times 2 \times 2$ ou $a \times 2^2$ microbes;

Après x bipartitions, nous avons $a \times 2^x$ microbes.

Au bout de H. heures, c'est-à-dire après x bipartitions, nous devons avoir b microbes; nous avons donc :

$$a \times 2^x = b$$

$$\text{d'où } 2^x = \frac{b}{a}$$

$$\text{et } x = \frac{\log.\ b - \log.\ a}{\log.\ 2}.$$

Au bout de H. heures (ou H $\times$ 60 minutes) il s'est produit x bipartitions; la durée moyenne d'une bipartition, ou temps de génération t pendant cette période est donc, en minutes, de :

$$t = \frac{H \times 60}{x} = \frac{H \times 60 \times \log. 2}{\log.\ b - \log.\ a}.$$

A l'aide de cette formule, nous avons calculé les temps de génération des microbes, à différentes périodes de nos trois séries d'essais de numération du B. Coli, cultivé en milieu synthétique de Péré.

Nous avons groupé dans le Tableau XVIII ci-dessous ces différents temps de génération.

TABLEAU XVIII

Temps de génération du B. Coli à différentes périodes de la culture.

HEURES de culture	TEMPS DE GÉNÉRATION EN MINUTES		
	Essai 2	Essai 4	Essai 6
0 — 2	150	120	75
2 — 5	120	200	117
5 — 8	70	62	82

— Nous allons voir maintenant si les périodes de division cellulaire, établies d'après les observations morphologiques, étaient bien en rapport avec les différents temps de génération calculés plus haut, et en même temps avec les diverses phases de la multiplication microbienne.

De l'heure 0 à la cinquième heure de culture, les microbes étaient encore dans la phase de latence, en milieu synthétique (*). La multiplication était faible et le temps moyen de génération était de 2 h. 30. Nous avons vu au paragraphe précédent que cette période de faible multiplication se traduisait morphologiquement par un allongement des germes succédant à une période d'adaptation (v. Tableaux XV, XVI).

C'est seulement entre la quatrième et la cinquième heure que se manifestait une faible division cellulaire, se traduisant par un raccourcissement de quelques germes.

Entre la cinquième et la huitième heure, phase logarithmique établie d'après les essais de numération, le temps de génération était beaucoup plus court (70—62—82 minutes). C'est aussi la période de division cellulaire importante établie d'après nos observations morphologiques (augmentation des formes de 2μ aux dépens de celles de 2μ,6 vers la septième heure).

Les fluctuations morphologiques traduisaient encore quelques périodes de divisions cellulaires plus ou moins importantes vers les dixième et douzième heures, c'est à-dire entre la fin de la phase logarithmique et le commencement de la phase de multiplication ralentie des essais de numération. Mais à partir de la huitième heure, nous n'avons pu établir avec précision les temps de génération, puisque nos essais de numération n'ont pas été effectués entre les huitième et vingt-quatrième heures de culture.

(*) En bouillon de viande, où la phase de latence s'arrêtait à la 2e heure de culture, nous avons vu que les variations morphologiques traduisaient une division cellulaire à la 2e heure de culture (v. Tableau XVII).

Conclusions de l'étude des variations morphologiques du B. Coli.

De tout ce qui précède, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

Le B. Coli se comportait morphologiquement d'une façon à peu près identique en milieu synthétique de Péré et en bouillon de viande.

Nous avons remarqué cependant deux points différents qui provenaient de la nature de ces deux milieux :

1° En milieu synthétique, à la première heure de culture, nous avons remarqué un ratatinement des germes, dû très vraisemblablement à une adaptation difficile des microbes à ce milieu. En bouillon de viande, nous n'avons pas observé ce ratatinement.

2° Les variations morphologiques ont traduit une période de division cellulaire se produisant plus tôt en bouillon de viande (deuxième heure de culture) qu'en milieu synthétique (quatrième, cinquième heure).

Tout ceci est d'ailleurs en concordance avec les résultats des essais de numération.

A partir de la quatrième heure et jusqu'à la neuvième heure de culture, les variations morphologiques ont traduit une période de division cellulaire active. Les alternatives de repos, division, repos, division, semblent coïncider avec les temps de génération des germes (de une heure à une heure et demie).

L'étude morphologique nous a montré que les microbes continuaient à se diviser de la huitième à la douzième heure, et que les périodes de division cellulaire étaient encore fréquentes pendant cet intervalle de temps, ce qui coïncide avec les résultats des numérations.

A partir de la vingt-quatrième heure, les prélèvements

espacés et la prédominance des formes de vieillesse ne nous donnaient plus de renseignements intéressants.

— Revenons maintenant à notre point de départ.

Nous avons remarqué, lors des études numériques et pondérales du Staphylocoque et du Colibacille, que l'augmentation des nombres des germes s'effectuait à un rythme beaucoup plus rapide que celle de leurs poids. Nous avons noté d'autre part une diminution du poids de chaque germe à partir de la phase de multiplication logarithmique et nous avons pensé que cette diminution pondérale pourrait peut-être s'expliquer par des modifications dans la morphologie des bactéries.

C'est en vue d'éclaicir ce point que nous nous sommes proposé d'étudier les variations morphologiques du Colibacille au cours de son développement.

Cette étude nous a montré que, à l'exception du « ratatinement » observé au départ en milieu synthétique et dû plutôt à une adaptation des germes au milieu, et malgré quelques petites variations, les microbes ont conservé sensiblement la même épaisseur au cours de la culture. D'autre part, malgré les nombreuses fluctuations observées dans la longueur des germes, ceux-ci tendaient dans l'ensemble à s'allonger, si bien qu'à la vingt-quatrième et à la quarante-huitième heure, c'est-à-dire aux heures où ils atteignaient leur maximum numérique, certains étaient plus longs qu'aux premières heures et restaient presque aussi gros. Et pourtant, c'est à ce moment que les microbes présentaient individuellement leur poids minimum. On peut donc conclure de ces faits que la diminution de poids des germes n'est pas due à une réduction de leur taille. Autrement dit, les variations du poids des germes ne sont pas fonction de leur état morphologique.

Il ne reste donc plus qu'une hypothèse plausible :

C'est que ces variations pondérales soient attribuables à des modifications dans la structure des bactéries au cours de leur développement.

L'âge de la culture influe en effet sur la constitution des cellules microbiennes : les cellules des cultures jeunes se colorent plus uniformément que les cellules âgées, dans lesquelles apparaissent des granulations d'hydrate de carbone ou de matières protéiques; dans les cultures âgées, se produisent des phénomènes d'autolyse, les produits d'autolyse pouvant diffuser dans le milieu environnant.

Les corps bactériens subissent donc au cours de leur développement d'importantes modifications dans leur composition chimique. Certains auteurs, tel que Julius Hirsch (38) ont fait à ce sujet des études intéressantes.

Ce dernier auteur a trouvé qu'au moment de la multiplication, la teneur en phosphore des germes est relativement haute, alors qu'après cette multiplication, on décèle un appauvrissement en phosphore. Pendant la période végétative (ou de repos), il y a assimilation de substances privées d'azote (hydrate de carbone) qui disparaissent au début de la multiplication suivante.

Hirsch a remarqué encore qu'à mesure que vieillit la culture, et que le temps de génération devient de plus en plus grand, le ralentissement du processus de multiplication est accompagné d'un appauvrissement en phosphore des germes.

Il est fort possible que ce soit l'appauvrissement en constituants chimiques qui entraîne une diminution du poids des microbes.

Nous avons pensé également qu'une multiplication intensive des bactéries pouvait jouer un certain rôle dans la perte de leur poids.

Si nous considérons les résultats réunis dans le Tableau VI *ter*, nous remarquons que, à quantités égales de germes (un million), les poids calculés en milieu synthétique restent toujours supérieurs à ceux calculés pour le bouillon de viande. Mais, entre la vingt-quatrième heure et le septième jour (où les germes étaient respectivement dans leur phase de multiplica-

tion ralentie et de maximum stationnaire), les poids sont seulement dix fois plus grands en milieu synthétique qu'en bouillon de viande; ce rapport a atteint au contraire 40 aux cinquième et huitième heures, c'est-à-dire au moment de la phase logarithmique. Notons qu'à cette période, la multiplication était beaucoup plus accélérée en bouillon de viande qu'en milieu synthétique. Si la diminution du poids des microbes était due uniquement aux milieux de culture, l'écart des rapports précédents devrait être plus ou moins négligeable. Or cet écart est assez grand, et il pourrait être alors le fait d'un autre facteur. Nous avons vu que les variations morphologiques ne jouaient pas un grand rôle dans les variations pondérales des bactéries. L'écart des rapports précités ne peut donc être imputé qu'à une multiplication très intense des germes dans le bouillon de viande pendant la phase logarithmique. Et l'on peut supposer que cette multiplication intensive appauvrit les cellules bactériennes en constituants chimiques, diminuant ainsi leur poids.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

L'étude numérique du Staphylocoque doré nous a permis de constater que ce germe se multipliait moins bien en milieu synthétique qu'en bouillon de viande. Cependant, pour la majorité des germes, la vitalité semblait plus durable dans le premier milieu. L'étude pondérale de ce germe nous a conduit à noter que si la masse bactérienne développée était plus importante en bouillon de viande, par contre, chaque germe considéré isolément présentait un poids moyen plus fort en milieu synthétique.

Les études numériques et pondérales de cultures de Staphylocoques et de Colibacilles nous ont montré que l'augmentation des nombres de microbes était toujours beaucoup plus forte que l'augmentation de leurs poids; nous avons pu noter également que les bactéries, après une augmentation pondérale pendant la phase de latence, diminuaient ensuite progressivement de poids individuel; celui-ci tendait à devenir constant à partir de la vingt-quatrième heure de culture.

Enfin, dans l'étude des variations morphologiques du Colibacille, nous avons remarqué que ce germe se comportait d'une façon à peu près identique en milieu synthétique et en bouillon de viande. Cette étude nous a montré également que la diminution du poids individuel des microbes au cours de leur développement n'est pas fonction de leurs modifications morphologiques. Cette variation pondérale pourrait être attribuée à des modifications dans la structure des bactéries au cours de la culture, et plus particulièrement à l'appauvrissement des corps bactériens en constituants chimiques, appauvrissement en corrélation avec la multiplication des germes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Almquist (E.). — Studien über das Verhalten einiger pathogenen Microorganismen bei niedriger Temperatur. *Centr. f. Bakt., Or.*, **48**, 1908, p. 175.
   — Studien über filtrierbare Formen in Typhuskulturen. *Centr. f. Bakt., Or.*, **60**, 1911, p. 167.
   — Wuchsformen, Fruktification, und Variationen der Typhusbakterie. *Ztsch. f. Hyg.*, **83**, 1917, p. 1.
   — Variation and life cycles of pathogenic bacteria. *Journ. Inf. Dis.*, **31**, 1932, p. 483.
   — Biologische Forschungen über die Bakterien. Stokholm, 1925, P. A. Norstedtelsoner.
2. Anderson (C. G.). — An Introduction to bacteriological chemistry. *E. et S. Levingston*, Edinburgh, 1938.
3. Aubel (E.). — Remarques sur la croissance du B. Coli en milieu chimiquement défini. *An. de Physiol. et Physico Chim. biol.*, **2**, 1926, p. 73.
4. Bach (D.). — Sur l'emploi des creusets à plaques de verre fritté pour la détermination pondérales des bactéries. Etude du développement du staphylocoque doré. *Bull. Sc. Pharm.*, **44**, 1937, p. 479.
5. Bachrach (E.). — Variations biologiques d'un organisme monocellulaire. Accoutumance et anaphylaxie chez le bacille lactique. *Thèse Sc.*, Paris 1924.
6. Baruch (L.). — Untersuchen über die Lange einiger Bakterienarter mit Berücksichtigung der kollektivmassehere. *Inaug. Dissert. Königsberg*, 1616, *Centr. f. Bakt.*, **66**, p. 261.
7. Beyerinck (W. M.). — Ueber Spirillum desulfuricans als Ursache von Sulfatreduction. *Centr. f. Bakt.*, **1**, 1895, p. 1.
8. Bergstrand (H.). — Uber sogenannte Corynebakterien und ihre Verwandten, nebst Bemerkungen über Bakterien im allgemeinen. *Acta medica Scandinavia*, **52**, 1919, p. 1.
   — On the struture of bacteria. *Ib.* **55**, 1921, p. 529.
   — Further studies on the morphology of bacteria. *Journ. bact.*, **8**, 1923, p. 365.
9. Berthelot (A.). — Nouvelles remarques d'ordre chimique sur le choix des milieux de culture naturels et sur la manière de formuler les milieux synthétiques. *Bull. Soc. Ch. Biol.*, **16**, 1934, p. 1.553.

10. Biernacki (E.). — Uber die Eigenschaft der Antiseptica, die Alkoholgährung zu beschleuningen und über gewisse Abhängigkeit ihrer Kraft von der chemischen Baustruktur, der Fermentmenge und der Vereinigung miteinander. *Pflüger's Arch.*, **49**, 1891, p. 112.

11. Bonnier (G.). — Sur la résistance à la sursalure des bactéries marines. *C. R. Ac. Sc.*, **160**, 1915, p. 443.
— De l'action morphogénique de la sursalure sur les bactéries marines. *C. R. Ac. Sc.*, **160**, 1915, p. 608.

12. Braun (H.). — Die Nahrungsbedürfnisse der Dipteriebazillen in synthetischen Nährböden in qualitativer Hinsicht. *Centr. f. Batkt. Or.*, **113**, 1929, p. 530.

13. Buchner (H.), Longard (K.) et Riedlin (G.;). — Uber die Vermehrungs geschwindigkeit der Bakterien. *Centr. f. Bakt. und Par.*, **2**, 1887, p. 1.

14. Cardot (G. et H.). — Analogie entre les ferments lactiques et les streptocoques au point de vue de l'action des antiseptiques. *C. R. Ac. Sc.*, **165**, 1917, p. 272.

15. César (R.). — Influence de l'acide safifiant l'ammoniaque sur le développement du B. Pyocyanique, du Saccharomyces Cerevisæ et de l'Aspergillus Niger. *Thèse Pharm. (Etat)*, Paris, 1946.

16. Chassevant (A.). — Action des sels métalliques sur la fermentation lactique. *Thèse Méd.* Paris, 1897, et *Trav. lab. Ch. Richet*, **6**, **1898**, p. 264.

17. Chesney (A. M.). — The latent period in the growth of bacteria. *J. of exp. Med.*, **24**, 1916, p. 414.

18. Clark (P. F.) et Ruehl (W. H.). — Morphological changes during the growth of bacteria. *J. of Bact.*, **4**, 1919, p. 615.

19. Cohn (F.). — *Beitr., z. Biol d. Pflanzen*, **1**, 1875, p. 127.

20. Conradi et Kurpjeweit. — D'après E. Wedemann. *Centr. f. Bakt. Or.*, **143**, 1939, p. 253.

21. David (R.). —Contribution à l'étude numérique de la multiplication du bacille pyocyanique dans différents milieux de culture liquides *Thèse Sc.* Chartres, *Durand*, 1931.

22. Eijkmann (C.). — Uber thermolabile Stoffwechselprodukte als Ursache der natürlichen Wachstumshemmung der Mikroorganismen. *Centr. f. Bakt. und Par., Or.*, **37**, 1904, p. 436.

23. Enderlein (G.). — Bakterien Cyclogenic. *Berlin und Leipzig, w. de Gruyterotto*, 1925, p. 390.

24. Faguet (M.). — La photoélectricité dans l'enregistrement de la croissance bactérienne. Paris, *Hermann et C^ie*, 1941.

25. Fermi (C.). — Weitere Untersuchungen über die tryptischen Enzyme der Mikroorganismen. *Arch. f. Hyg.*, **14**, 1892, p. 1.

26. Fildes (P.). — The growth of Proteus on ammonium lactate plus nicotic acid. *Brit. J. exp. Path.*, **19**, 1938, p. 239.

27. Flexner, His Y. et Strong. — D'après Lowff. *Annales I. P.*, **61**, 1938, p. 580.

28. Fries. — Eine einfache Methode zur genauen Bestimmung der Bakterienmengen in Bakteriensuspensionen. *Centr. f. Bakt., Or.*, **86**, 1921, p. 90.

29. Fuhrmann (F.). — Entwicklungszyklen bei Bakterien. *Beihafte z. Botan. Cent.*, 23 (Abt. I), 1908.
— Einführung in die Grundlagen der technichen-Mykologie. Zweite Auflage. *Gustave Fischer*, Iena, 1926.

30. Gladstone (G. P.). — The nutrition of *Staphylococcus aureus :* Nitrogen requirements. *Brit. J. exp. Path.*, **18**, 1937, p. 322.

31. Glynn (E.), Powel (M.), Rees (A. A.) et Cox (G. L.). — Observations upon the standardisation of bacterial vaccines by the Wright, the haemocytometer and the plate culture methods. *J. of Path. and Bact.*, **18**, 1913-1914, p. 379.

32. Guignard (L.) et Charrin (A.). — Sur les variations morphologiques du Bacille Pyocyanique. *C. R. Ac. Sc.*, **105**, 1889, p. 1192.

33. Hehewerth (F. H.). — Die mikroskopische Zählungsmethode der Bakterien von Alex Klein, und einige Anwendungen derselben. *Arch. f. Hyg.*, **39**, 1901.

34. Henrici (A. T.). — Differential counting of living and dead cells of bacteria. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, **20**, 1923.

35. Henrici (A. T.). — A statistical study of the form and growth of *Bacterium Coli, Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, **21**, 1923, p. 215.
— Influence of age of parent culture on size of cells of *Bacillus Megatherium. Ib.*, **21**, 1924, p. 345.
— Influence of concentration of nutrients on size of cells of *Bacillus Megatherium. Ib.*. **21**, 1924, p. 345.
— Morphologic variations and the rate of growth of bacteria. London, *Baillère, Tindall et Cox*, 1928.

36. Henriques (O. M.). — Technique de numération des bactéries. *C. R. Soc. Biol.*, **88**, 1923.

37. Hesse (W.) et Riedner. — Die quantitative Bestimmung von Bakterien in Flüssigkeiten. *Zeit. f. Hyg.*, **53**, 1906, p. 259.

38. Hirsch (J.). — Zur Physiologie und chemie der Keimvermehrung. *Centr. f. Bakt., Or.*, **127**, 1933, p. 116.

39. Hort. — Morphologic studies in the life histories of bacteria. *Proc. Roy. Soc. Lond.*, ser. B, **89**, 1917, p. 468.

40. Jensen (K. A.). — Durch direkte mikroskopische Beobactung ausgeführte Untersuchungen über das wachstum der Coli-Bazillus. *Centr. f. Bakt., Or.*, **107**, 1928.

41. Jund (Y.). — De la morphologie et de la vitalité du Colibacille au cours de sa multiplication « in vitro ». *Thèse Pharm.* Paris, 1938.

42. Klein (Alex). — Eine einfache Methode zur Sporenfärbung. *Centr. f. Bakt. und Par.*, **25**, 1899, p. 376.

43. Knight (B. C. J. G.). — Bacterial nutrition. *Med. Res. Council. Spec.* Report n° 210. H. M. Stationnary office. London, 1936.

44. Knight (B. C. J. G.). — The Nutrition of *Staphylococcus aureus*. nicotinic acid and Vitamine B_1. *Bioche. J.*, **31**, 1937, p. 731.

45. Knight (B. C. J. G.). — The nutrition of *Staphylococcus aureus*. The activities of nicotinamide, aneurin (Vitamine B_1) and related compounds. *Ib.*, p. 966.

46. Kogl (F.) et Wagtendonk (W. J.). — Ueber die Bedeutung von Biotin für das Wachstum von *Staphylococcus pyogenes aureus*. *Rev. Trav. Chim. Pays-Bas*, **57**, 1938, p. 747.

47. Koser (S. A.), Finkle (R. D.), Dorfman (A.), Saunders (F.) and Gordon (M. V.). — Studies on bacterial nutrition. A comparative study of the growth-promoting properties of various substances. *J. of Inf. Des.*, **62**, 1938, p. 209.

48. Koser (S. A.), Dorfman (A.) et Saunders (F.). — The activity of certain nicotinic acid derivatives as growth essential for dysentery bacillus. *J. Am. Chem. Soc.*, **60**, 1938, p. 2.004.

49. Krasnow (F.), Rivkin (H.) et Rosenberg (M. L.). — A method of studying the availibility of synthetic media for *Streptococci. J. of. Bact.*, **12**, 1926, p. 385.

50. Lambin (S.). — Méthodes de mesure de l'activité antimicrobienne des substances chimiques. *Thèse Sc.*, Paris, 1933.

51. Landy (M.). — Effect of nicotinic acid, its isomers and related compounds upon nutrition of *Staphylococcus aureus*. *Proc. Soc. exp. Biol. a. Med.*, **38**, 1938, p. 504.

52. Lohnis (F.). — Studies upon the life cycles of bacteria. *Mémoires Nat. Ac. Sc.*, **16**, 1921.

53. Lory (R.). — Etude de l'influence sur le croit microbien des actions à distance produites par les métaux non radio actifs et par les organismes cellulaires en voie de multiplication active (rayonnements mitogénériques). *Thèse Sc.*, Paris, 1944.

54. Lwoff (A.). — Les facteurs de croissance pour les microorganismes. *Annales I. P.*, **61**, 1938, p. 580.

55. Lwoff (A.) et Dusi (H.). — La pyrimidine et le thiazol, facteurs de croissance pour le flagellé *Polytomella cœca*. *C. R. Ac. Sc.*, **205**, 1937, p. 630.

56. Martin (D S.). — The oxygen consumption of *Escherichia Coli* during the lag and logarithmic phases of growth. *Journ. Gen. Physiol.*, **15**, 1932, p. 691.

57. Mellon (R. R.). — The life cycle changes of the so-called B. Hodgkun and their relation to mutation changes in this species. *Journ. Med. Res.*, **42**, 1920, p. 61.
— Studies in microbic heredity. — I. Observations on a primitive form of sexuality (zygospore) in the colon typhoïd group. *J. of Bact.*, **10**, 1925, p. 481. — II. The sexual cycle of B. Coli in relation to the origin of variants with special reference to Neisser and Massini's B. Coli mutabile. *Ib.*, **10**, 1925, p. 579.— III. The hereditary origin of group and specific agglutinogens amoung the Colon-alkaligenes organisms. *J. of Immun.*, **11**, 1926, p. 139.

58. Miller. — Einige kurze Notizen in Bezug auf Bakteriologische Untersuchungsmethoden. *Centr. f. Bakt. und Par.*, **15**, 1894, p. 894.

59. Monod (J.). — Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Paris, *Hermann et C^ie*. 1942.

60. Mueller (J. H.). — Nicotinic acid as a growth accessory substance for the diphteria bacillus. *J. of Bact.*, **34**, 1937, p. 429.

61. Muntsch (O.). — Ein Beitrag zur kulturellen Keimzählmethode. *Centr. f. Bakt. und Par.*, **114**, 1929, p. 438.

62. Naegeli (C.). — Untersuchungen über niedere Pilze aus dem Pflanzen-physiologischen Institut in München, 1882.

63. Neipp (L.). — De l'influence de divers cations sur le croît microbien. *Thèse Sc.*, Paris, 1937.

64. Péré (A.). — Contribution à la biologie du *Bacterium Coli commune* et du Bacille Typhique. *Annales I. P.*, **6**, 1892, p. 512.

65. Petit (A.). — D'après Miquel. *C. R. Ac. Sc.*, 1872.

66. Ramon (G.), Boivin (A.) et Richou (R.). — Sur l'obtention de la toxine et de l'anatoxine staphylococcique dans un milieu de composition chimiquement définie. *C. R. Ac. Sc.*, **207**, 1938, p. 466.

67. Reader (V.). — The relation of the growth of certain microorganisms to the composition of the medium. *Biochem. J.*, **21**, 1927, p. 908.

68. Regnier (J.) et Lambin (S.). — De la méthode de numération microbienne basée sur le dénombrement des colonies développées sur milieux solidifiés. Les dilutions de la suspension initiale sont-elles à rejeter ? *C. R. Soc. Biol.*, **114**, 1933, p. 983.

69. Regnier (J.) et Lambin (S.). — Comparaison des variations de forme des bactéries, dans un même milieu, suivant la grandeur de l'ensemencement. *C. R. Soc. Biol.*, **135**, 1941, p. 275.

70. Regnier (J.) et Lambin (S.). — Introduction à l'étude des antiseptiques. Etude numérique du croît d'un bacille pyocyanique dans un milieu de culture liquide. *Bull. Sc. Pharm.*, **34**, 1927, p. 401 et 490.

71. Regnier (J.) et Neipp (L.). — Contribution à l'étude des méthodes de numération des microbes. Numération de la totalité des microbes visibles. *Bull. Sc. Pharm.*, **41**, 1934, p. 152.

72. Richardson (G. M.). — The nutrition of *Staphylococcus aureus*. Necessity for uracil in anaerobic growth. *Biochem. J.*, **30**, 1936, p. 2184.

73. Richet (Ch.) et Cardot (H.). — Des antiseptiques réguliers et irréguliers. *C. R. Ac. Sc.*, **165**, 1917, p. 491.

74. Ronchese (A. M.). — La numération des bactéries et les divers modes de détermination quantitative de la richesse en germes des suspensions microbiennes. *Thèse Pharm.*, Nice, 1943.

75. Ruata (G.). — Quantitative Analyse bei der bakteriogischen Diagnose der Wässer. *Centr. f. Bakt. und Par.*, **11**, 1904, p. 220 et 287.

76. Sabouraud. — Méthode de Sabouraud pour la préparation des vaccins staphylococciques. (D'après Calmette, Nègre et Boquet, p. 531.)

77. Sartory (A.) et Meyer (J.). — Etude du développement du Colibacille *Escherichia Coli* sur milieu synthétique ammoniacal par le conrtôle de l'acidification du milieu. *Bull. Ac. Med.*, **130**, 1946, p. 435.

78. Sartory (A. et R.), Meyer (J.) et Merglen (M. I.). — Facteurs activants thermostabiles d'origine cryptogamique favorisant la croissance des Bactéries. *C. R. Ac. Sc.*, **203**, 1936, p. 280.

79. Sartory (A.), Meyer (J.) et Schmutz (D.). — Méthodes de dosage des bactéries. Comparaison des résultats néphélométriques avec ceux obtenus par la numération des germes au moyen de l'hématimètre. *Bull. des biol. Pharmaciens*, **44**, 1939, p. 40.

80. Schopfer (W. H.). — La spécificité d'action de l'aneurine sur *Phycomyces*. Le rôle des constituants de l'aneurine et de leurs produits de substitution. *Bull. Soc. Botan. Suisse*, **47**, 1937, p. 460.

81. Stapp (C.) et Zycha (H.). — Morphologische Untersuchungen an *Bacillus mycoïdes;* ein Beitrag zur Frage des Pleomorphismus der Bakterien. *Arch. f. Mikrobiol.*, **2**, 1931, p. 493.

82. Tatum (E. L.), Wood (H. G.) et Peterson (W. H.). — Growth factors for bacteria. Vitamin B_1, a growth stimulant for propionic acid bacteria. *Biochem. J.*, **30**, 1936, p. 1898.

83. Thoni (J.) et Thaysen (A. C.). — Experimentelle Untersuchungen zur Feststellung der Mindeszahl von Bacillen, die beim Meerschweinchen noch Tuberculose hervorruft. *Centr. f. Bakt. und Par., Or.*, **77**. 1915-16, p. 308.

84. Troester. — Verfahren zum Zählen abgetöteter Bakterien in Aufschwemmungen. *Centr. f. Bakt., Or.*, **88**, 1922, p. 252.

85. Uschinsky (N.). — Ueber eine eiweissfreie Nährlösung für pathogene Bakterien nebst einigen Bemerkungen über Tetanusgift. *Centr. f. Bakt. Or.*, **14**, 1893, p. 316.

86. Vles (F.). — Recherches sur quelques propriétés optiques des suspensions biologiques et leur application à l'opacimétrie bactérienne. *Arch. de phys. biol.*, **1**, 1921, p. 189.

87. Wikullil (Léo v.). — Zur Bestimmung der Keimzahl bakterieller Impfstoffe. *Centr. f. Bakt., Or.*, **100**, 1926, p. 379.

88. Williams (R. J.). — *J. Am. Chem. Soc.*. **55**, 1933, p. 2912 et **56**, 1934, p. 169.

89. Widnogradsky (S.). — Zur Mikrobiologie des Nitrifikationsprozesses. *Centr. f. Bakt.*, **2**, 1896, p. 425.

90. Wright (A. E.). — On some new procedures for the examination of the blood and of bacterial cultures. *The Lancet*, London, **2**, 1902, p. 11.

91. Young (E. G.), Begg (R. W.) et Pentz (B. I.). — The inorganic nutrient requirements of « *Escherichia Coli* ». *Arch. Biochem.*, **5**, 1944, p. 121.

Vu :
le Doyen de la Faculté de Pharmacie,
R. Fabre.

Vu :
le Président de thèse,
A. Sartory.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
G. Roussy.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

Introduction 9

CHAPITRE I

Rappel des techniques utilisables et description des techniques utilisées pour l'étude quantitative de la multiplication microbienne.

A. — *Rappel sommaire des techniques utilisables pour l'étude quantitative de la multiplication microbienne.* 12

1° Méthodes numériques. 13
2° Méthodes pondérales 15
3° Méthodes néphélémétriques 17
4° Méthodes biochimiques. 18

B. — *Description des techniques utilisées au cours de nos essais.* 20

a) Technique de dénombrement après dilution et ensemencement sur gélose 20
b) Technique de dénombrement microscopique indirect 22
c) Technique de pesée. 26

CHAPITRE II

Etude comparative de la multiplication du staphylocoque doré en milieu synthétique et en milieu naturel.

A. — *Quelques données relatives à la culture des bactéries en milieux synthétiques* 33

B. — *Essais personnels* 41
Milieux utilisés 41
a) Milieu synthétique 41

b) Milieu naturel 42

Souche employée 42
Essais réalisés. 42
Résultats obtenus 43
Discussion des résultats : 58

1° Résultats obtenus par dénombrement des bactéries sur plaques de gélose. 58
2° Résultats obtenus par la méthode de pesée 63
3° Comparaison des résultats fournis par les méthodes de numération et de pesée 68

Conclusion 74

CHAPITRE III

Etudes de la multiplication et des variations morphologiques du colibacille, cultivé en milieu synthétique.

PREMIÈRE PARTIE

Etude de la multiplication du colibacille dans un milieu synthétique.

Essais personnels 77

Souche employée. 77
Milieu synthétique employé. 77
Essais réalisés. 77
Résultats obtenus 78
Discussion des résultats : 86

1° Résultats obtenus par dénombrement des bactéries. 86
2° Résultats obtenus par la méthode de pesée 87
3° Comparaison des résultats fournis par les méthodes de numération et de pesée. 90

Conclusion 95

SECONDE PARTIE

Etude morphologique du colibacille en fonction de l'âge de la culture

A. — *Rappel sommaire des principaux travaux concernant les variations morphologiques des bactéries* 96

B. — *Essais personnels* 102

Souche employée. 102
Milieux de culture utilisés 102
Essais réalisés 102
Techniques employées 103
1° Technique de la « chambre claire ». 103
2° Technique de la microphotographie 104

Résultats obtenus. 107
1° Résultats obtenus par la méthode de la « chambre claire » 107
2° Résultats obtenus par microphotographie 110
a) Interprétation des résultats obtenus par microphotographie (Étude détaillée de l'essai 3) 114
b) Comparaison des résultats obtenus en milieu synthétique et en bouillon de viande. 122
c) Interprétation des courbes. 127
d) Relation entre les périodes de division des germes et les diverses phases de leur multiplication. . . . 132

Conclusion de l'étude des variations morphologiques . . . 135

Conclusions générales 139

Bibliographie 140

Imp. Polyglotte VUIBERT
6, rue Martel, Paris.